

Epidemiologie und Mikrobiomzusammensetzung bei frühkindlicher Karies

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Frederic Uwe Meyer
aus Salzgitter, Deutschland

1. Referentin: Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler
2. Referent: Prof. Dr. Michael Steinert
eingereicht am: 24.03.2017
mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.05.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Meyer, F., Karch, A., Schlinkmann, K.M., Dreesman, J., Horn, J., Rübsamen, N., Sudradjat, H., Schubert, R. & Mikolajczyk, R. Sociodemographic determinants of spatial disparities in early childhood caries – an ecological analysis in Braunschweig, Germany.

Unter Begutachtung in Community Dentistry and Oral Epidemiology

Tagungsbeiträge und Poster:

Meyer F., Sztajer H., Kühnisch J., Mikolajczyk R. & Wagner-Döbler I.: Microbiome of Early Childhood Caries (ECC). (Poster) Annual conference of the association for General and applied Microbiology (VAAM) in collaboration with Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Dresden, Germany (2014)

Meyer F., Sztajer H., Kühnisch J., Wagner-Döbler I: Who comes and goes: A study on the human oral microbiome. (Poster) 2nd International Conference on Porphyromonas gingivalis and related species in oral and systemic diseases. London, Great Britain (2015)

Meyer F., Schlinkmann K.M., Karch A., Horn J., Schubert R., Sudradjat H., Mikolajczyk R.: Soziodemographische Determinanten für Milchzahnkaries– eine ökologische Analyse in Braunschweig. Annual conference of the German association for epidemiology (DgEpi). Potsdam, Germany (2015)

Meyer F., Karch A., Schlinkmann K.M., Dreesman J., Horn J., Rübsamen N., Schubert R., Sudradjat H., Mikolajczyk R.: Soziodemographische Determinanten für die räumliche Ungleichheit bei Milchzahnkaries– eine ökologische Analyse in Braunschweig, Deutschland. Annual conference of the German association for spatial statistics. Potsdam, Germany (2016)

Allen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben

Abstract

Background: Early childhood caries (ECC) affects more than one third of the children in Germany with primary dentition. Reliable data on the distribution in Germany or on a small-scale city level are not available. It is known that children from poor families have more decayed teeth than children from wealthy families. As a trigger for caries, several bacteria have already been identified (for example *Streptococcus*, *Veillonella* or *Prevotella*). Caries is a polymicrobial disease, in which no specific bacteria can be described as infectious.

Objectives: (1) Analysis of the spatial autocorrelation of ECC in daycare centers in Braunschweig, and a temporal analysis of these data from 2009-2014, (2-5) the analysis of the microbiome of carious and non-carious children from three different studies, and (6) a comparative analysis of microbial composition before and after tooth brushing.

Methods: Data from the epidemiological cross-sectional study were analyzed using a spatial lag model. The analysis of the microbial composition was carried out after DNA extraction with Next Generation Sequencing.

Results: With the epidemiologic study, we identified clusters of high dmft (decayed missing filled teeth) indices in city and were able to show that these clusters can be explained by sociodemographic disparities. The dmft index has decreased from 2009 to 2014 in Braunschweig (1). The “KraKi”-study showed at least 5% of the participants with decayed teeth (2). The main genera identified in these samples belonged to *Streptococcus* followed by *Neisseria*. However, sequencing depth problems appeared and led to a limited sample size. The microbiota of children from Indonesia showed similar results with *Neisseria* followed by *Streptococcus* (3). The comparison of these two projects showed no significant differences of the dental plaque composition (4). The clinical samples showed no differences comparing ECC and healthy samples (5). However, two different groups could be identified. While one group was characterized by samples from healthy and ECC individuals, the second group was characterized by samples from ECC individuals only. The first group showed the genera *Brevibacterium* and *Haemophilus* to be more abundant, and the second group was characterized by *Actinomyces*, *Tannerella* and *Neisseria*. Finally (6), biomarker identification showed *Neisseria elongata* and *Streptococcus oralis* within the dental plaque after tooth brushing, while *Streptococcus sobrinus* can be found in the matured plaque of healthy adults.

Zusammenfassung

Hintergrund: Die frühkindliche Karies (Milchzahnkaries) betrifft mehr als ein Drittel der Kinder in Deutschland mit Milchzähnen. Verlässliche Daten hinsichtlich der Verteilung in Deutschland oder auf kleinräumiger Stadtebene sind nicht verfügbar. Es ist bekannt, dass Kinder aus armen Familien mehr kariöse Zähne haben, als Kinder aus wohlhabenden Familien. Als Auslöser für die Karies sind mehrere Bakterien bereits identifiziert worden (zum Beispiel *Streptococcus*, *Veillonella* oder auch *Prevotella*). Karies zeigt somit einen polymikrobiellen Charakter, bei dem kein bestimmter Keim als Auslöser beschrieben werden kann.

Ziele: (1) Analyse der räumliche Autokorrelation der Milchzahnkaries in den Kindergärten in Braunschweig, sowie einer zeitlichen Verlaufsanalyse der Daten von 2009-2014, (2-5) die Analyse des Mikrobioms kariöser und nicht-kariöser Milchzähne von Kindern aus drei verschiedenen Studien und (6) eine vergleichende Analyse der Mikrobiomzusammensetzung vor und nach dem Zähneputzen.

Methoden: Die Daten der epidemiologischen Querschnittsstudie wurden mit einem spatial lag Modell analysiert. Die Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung wurde nach der DNA-Extraktion mit Next Generation Sequencing durchgeführt.

Ergebnisse: Wir konnten mit der epidemiologischen Studie Cluster von hohem dmft (decayed missing filled teeth)-Werten in der Stadt identifizieren und zeigen, dass diese Cluster durch soziodemographische Ungleichheiten erklärt werden können. Der dmft Index hat in Braunschweig von 2009-2014 abgenommen (1). Die „KraKi“-Studie zeigte, dass 5% der Teilnehmer mit Karies befallen waren (2). Hauptsächlich wurden in den Abstrichen Bakterien der Gattung *Streptococcus* und *Neisseria* identifiziert. Allerdings zeigten sich hier Probleme mit der Sequenzierentiefe, die zu einer geringen Probenanzahl führten. Die mikrobielle Plaquezusammensetzung bei Kindern aus Indonesien stellte sich ähnlich dar (3): *Neisseria* war die häufigste Gattung gefolgt von *Streptococcus*. Der Vergleich beider Studien zeigte keine signifikanten Unterschiede (4). Die klinischen Proben lieferten keine signifikanten Unterschiede zwischen Abstrichen von Probanden mit ECC und gesunden Probanden (5). Dennoch konnten zwei Gruppen identifiziert werden. Eine Gruppe bestand aus Proben von gesunden Kindern und Kindern mit ECC. Die zweite Gruppe beinhaltete ausschließlich Proben von Kindern mit ECC. Die erste Gruppe wurde charakterisiert durch die Gattungen *Brevibacterium* und *Haemophilus*. Die zweite Gruppe zeigte eine Dominanz von *Actinomyces* und *Tannerella*. Im abschließenden Teil (6) wurden Biomarker, die mit der Zahnplaque nach dem Zähneputzen waren, identifiziert. *Neisseria elongata* und *Streptococcus oralis* waren mit der Plaque vor dem Zähneputzen assoziiert, während *Streptococcus sobrinus* in der gereiften Plaque zu finden war.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-------------|
| Inhaltsverzeichnis | VII |
| Abbildungsverzeichnis..... | X |
| Tabellenverzeichnis | XII |
| Abkürzungsverzeichnis | XIII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Epidemiologie von Karies und frühkindlicher Karies | 1 |
| 1.1.1 Risikofaktoren..... | 1 |
| 1.1.2 Studientypen für die Untersuchung von Krankheiten..... | 2 |
| 1.2 Das Menschliche Mikrobiom..... | 4 |
| 1.2.1 Die mikrobielle Mundflora bei gesunden Menschen..... | 6 |
| 1.2.2 Erkrankungen der Zähne und des Zahnhalteapparates | 11 |
| 1.3 Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften..... | 20 |
| 1.3.1 Kulturbasierte Verfahren | 20 |
| 1.3.2 Molekularbiologische Verfahren und Next Generation Sequencing | 21 |
| 1.4 Ziele der Arbeit..... | 25 |
| 2 Material und Methoden | 26 |
| 2.1 Material..... | 26 |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien | 26 |
| 2.1.2 Enzyme | 26 |
| 2.1.3 Verwendete Kits | 26 |
| 2.1.4 Geräte..... | 26 |
| 2.1.5 Oligonukleotide | 27 |
| 2.2 Statistische Analyse der Milchzahnkaries bei Kindern in Braunschweig..... | 28 |
| 2.2.1 Datensätze..... | 28 |
| 2.2.2 Programme für die Datenauswertung | 28 |
| 2.2.3 Moran's I | 29 |
| 2.2.4 Lineare Analyse und Trajectories | 29 |
| 2.2.5 Spatial lag Modell..... | 30 |
| 2.2.6 Erstellung der Stadtkarten..... | 30 |
| 2.3 Studienplanung und Durchführung..... | 31 |
| 2.3.1 KraKi-Studie..... | 31 |
| 2.3.2 Zahnmikrobiom indonesischer Kinder | 33 |
| 2.3.3 Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies..... | 34 |
| 2.3.4 Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen | 34 |
| 2.4 Standardisierung der klinischen Untersuchung und Probenentnahme..... | 35 |
| 2.4.1 KraKi-Studie..... | 35 |
| 2.4.2 Zahnmikrobiom indonesischer Kinder | 35 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4.3 | Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies | 36 |
| 2.4.4 | Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen | 36 |
| 2.5 | DNA- Isolierung | 37 |
| 2.5.1 | PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) | 38 |
| 2.5.2 | Gelelektrophorese und Aufreinigung des PCR- Produktes | 39 |
| 2.5.3 | DNA-Konzentrationsmessung | 39 |
| 2.5.4 | Sequenzierung und Datenauswertung | 40 |
| 2.5.5 | Taxonomische Zuordnung | 40 |
| 2.5.6 | Programme für die Datenauswertung | 41 |
| 3 | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Statistische Analyse der Milchzahnkaries bei Kindern in Braunschweig | 42 |
| 3.1.1 | Longitudinale Analyse der dmft-Indizes | 42 |
| 3.1.2 | Moran's I Test der dmft-Indizes auf Stadtteilebene | 43 |
| 3.1.3 | Spatial lag Modell | 45 |
| 3.2 | Überblick über die Ergebnisse der Mikrobiom-Sequenzierung aller Studien | 46 |
| 3.3 | KraKi | 49 |
| 3.3.1 | Rekrutierung und Studienpopulation | 49 |
| 3.3.2 | Fragebogendaten | 51 |
| 3.3.3 | Zahnmikrobiom der Probanden | 54 |
| 3.4 | Zahnmikrobiom indonesischer Kinder | 60 |
| 3.4.1 | Probanden | 60 |
| 3.4.2 | Zahnmikrobiom der Probanden | 62 |
| 3.5 | Zahnmikrobiom von gesunden (KraKi-Studie) und kariösen Zähnen (Zahnmikrobiom indonesischer Kinder) | 68 |
| 3.6 | Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies | 71 |
| 3.6.1 | Probanden | 71 |
| 3.6.2 | Mikrobiomdaten | 72 |
| 3.7 | Vergleich der Projekte | 80 |
| 3.8 | Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen | 85 |
| 3.8.1 | Probanden | 85 |
| 3.8.2 | Qualität der Proben | 85 |
| 3.8.3 | Mikrobiomdaten | 86 |
| 4 | Diskussion | 91 |
| 4.1 | Statistische Analyse der Milchzahnkaries bei Kindern in Braunschweig | 91 |
| 4.2 | Überblick über die Ergebnisse der Mikrobiom-Sequenzierung aller Studien | 94 |
| 4.3 | KraKi-Studie | 95 |
| 4.4 | Zahnmikrobiom von indonesischen Kindern | 98 |
| 4.5 | Vergleich: KraKi-Studie und Zahnmikrobiom von indonesischen Kindern | 99 |
| 4.6 | Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies | 100 |
| 4.7 | Vergleiche der Projekte | 101 |
| 4.8 | Variabilität des oralen Mikrobioms im Tagesverlauf | 101 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | Fazit | 103 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 104 |
| 7 | Danksagung..... | 115 |
| 8 | Anhang..... | |
| | Anhang 1: Studiendokumente der KraKi-Studie | |
| | Anhang 2: Studienprotokoll Klinische Proben | |
| | Anhang 3: Manuskript „Sociodemographic determinants of spatial disparities in early childhood caries – an ecological analysis in Braunschweig, Germany“ | |
| | Lebenslauf..... | |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Multiple Risikofaktoren für frühkindliche Karies. | 2 |
| Abbildung 2: Zeitliche Übersicht von Studientypen. | 4 |
| Abbildung 3: Erkrankungen, die mit Erkrankungen des Zahnhalteapparates und oralen Mikroorganismen zusammenhängen. | 6 |
| Abbildung 4: Schematische Bildung eines Biofilms auf der Zahnoberfläche. | 10 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung eines gesunden Zahnes mit gesundem Zahnfleisch und eines kariösen Zahnes und kranken Zahnfleisches. | 12 |
| Abbildung 6 Entstehung von Löchern im Zahn. | 13 |
| Abbildung 7: Verschiedene Kariesstufen und die wesentlichen Bakterien des Mikrobioms. | 16 |
| Abbildung 8: Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung. | 16 |
| Abbildung 9: Schritte von der DNA zur Sequenz. | 23 |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung der Bindung und Bridge-Amplifikation der DNA- Fragmente zur Clusterbildung bei der Illumina-Technologie. | 24 |
| Abbildung 11: Herstellung der 16S rDNA-Amplikons. | 25 |
| Abbildung 12: Schematische Darstellung der Moran's I Test Statistik. | 29 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung der Lokalisation für die Probenentnahme. | 37 |
| Abbildung 14: Schematische Vorgehensweise bei der Zuordnung der Reads über OTUs bis zur Artebene. | 41 |
| Abbildung 15: Verlauf des durchschnittlichen dmft-Index auf Stadtebene. | 43 |
| Abbildung 16: Trajectories der dmft-Indizes auf Stadtteilebene. | 43 |
| Abbildung 17: Gewichteter durchschnittlicher dmft-Index pro Stadtteil (2014). | 44 |
| Abbildung 18: Taxonomische Zuordnung der OTUs. | 48 |
| Abbildung 19: Taxonomische Diversität der Proben. | 48 |
| Abbildung 20: PCoA der 314 Proben, die mehr als 4500 reads hatten. | 49 |
| Abbildung 21: Teilnehmende Kindergärten und Kindertagesstätten an der KraKi-Studie. | 50 |
| Abbildung 22: Response der Teilnehmer an der Studie. | 50 |
| Abbildung 23: Verteilung der Probanden auf die Einrichtungen der Stadt. | 51 |
| Abbildung 24: Baseline-Erhebung der teilnehmenden Haushalte. | 52 |
| Abbildung 25: Geschlechter- und Altersverteilung der Probanden. | 53 |
| Abbildung 26: Zahnarztbesuche pro Jahr. | 54 |
| Abbildung 27: Rarefaction curve der KraKi-Proben. | 55 |
| Abbildung 28: Rang-Häufigkeitskurve der identifizierten OTUs in den KraKi-Proben (Top 50). | 56 |
| Abbildung 29: Identifizierung der unterschiedlichen Klassen in den KraKi-Zahnabstrichen. | 57 |
| Abbildung 30: PCoA auf Kita-Ebene. | 58 |
| Abbildung 31: PCoA KraKi Geschlecht. | 59 |
| Abbildung 32: PCoA Alter. | 59 |
| Abbildung 33: Shannon-Diversitäts Index der KraKi-Proben aufgetrennt nach Geschlechtern. | 60 |
| Abbildung 34: Altersverteilung aufgeteilt nach Geschlechtern der Probanden des Indonesien-Projektes. | 61 |
| Abbildung 35: Kariesstatus der Probanden aufgetrennt nach Geschlecht. | 62 |
| Abbildung 36: Rarefaction curve der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder. | 63 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 37: Rang-Häufigkeitskurve der identifizierten OTUs in den Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder | 64 |
| Abbildung 38: Identifizierung der unterschiedlichen Klassen in den Zahnabstrichen des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder. | 65 |
| Abbildung 39: PCoA der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder aufgetrennt nach dem Geschlecht der Probanden..... | 66 |
| Abbildung 40: PCoA der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder aufgetrennt nach dem Alter der Probanden. | 66 |
| Abbildung 41: PCoA der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder aufgetrennt nach dem Kariesstatus der Probanden..... | 67 |
| Abbildung 42: Shannon-Diversität der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder, gruppiert nach Kariesstatus. | 67 |
| Abbildung 43: Vergleich der KraKi-Studie und des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder mit einer PCoA..... | 69 |
| Abbildung 44: Vergleich des Kariesstatus der KraKi-Studie und des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder mit einer PCoA..... | 70 |
| Abbildung 45: Shannon-Diversität der KraKi-Studie im Vergleich mit dem Zahnmikrobiom indonesischer Kinder. | 70 |
| Abbildung 46: Shannon-Diversität der KraKi-Studie und des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder unter Berücksichtigung des Kariesstatus der Probanden..... | 71 |
| Abbildung 47: Altersverteilung und Kariesstatus der Probanden aufgetrennt nach Geschlecht. | 72 |
| Abbildung 48: Rarefaction curve aller Proben der Studie. | 73 |
| Abbildung 49: Rarefaction curve der Proben von den Oberkiefer Frontschneidezähnen der Studie..... | 73 |
| Abbildung 50: Rang-Häufigkeit Verteilung der identifizierten OTUs auf Gattungsebene..... | 75 |
| Abbildung 51: Identifizierung der Klassen sortiert nach Kariestyp der Proben. | 76 |
| Abbildung 52: Shannon-Diversität der Proben nach Zuordnung zu den verschiedenen ECC-Typen..... | 77 |
| Abbildung 53: PCoA aller Proben der Studie zu dem Mikrobiom bei frühkindlicher Karies aus München.. | 78 |
| Abbildung 54: PCoA der Proben von den Frontschneidezähnen des Oberkiefers..... | 79 |
| Abbildung 55: Rang-Häufigkeit Verteilung der identifizierten OTUs. | 81 |
| Abbildung 56: Relative Häufigkeit ausgewählter Phyla in den Proben der einzelnen Projekte. | 82 |
| Abbildung 57: Relative Häufigkeit ausgewählter Gattungen in den Proben der einzelnen Projekte. | 83 |
| Abbildung 58: Relative Häufigkeit der häufigsten in den Proben aus München gefundener Arten im Vergleich der einzelnen Projekte. | 84 |
| Abbildung 59: Rarefaction curve der Proben..... | 86 |
| Abbildung 60: Rang-Häufigkeit Verteilung der identifizierten Klassen des Projektes zur Variabilität des oralen Mikrobioms (Top50)..... | 87 |
| Abbildung 61: Identifizierte Klassen sortiert nach Entnahmezeitpunkt der Proben. | 88 |
| Abbildung 62: PCoA der Proben des Projektes zur Variabilität. | 89 |
| Abbildung 63: Unterschiede in den Proben, die morgens vor dem Zähneputzen entnommen wurden und den Proben die nach dem Mittagessen entnommen wurden..... | 90 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien. | 26 |
| Tabelle 2: Verwendete Enzyme. | 26 |
| Tabelle 3: Verwendete Kits..... | 26 |
| Tabelle 4: Verwendete Geräte..... | 26 |
| Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide. | 27 |
| Tabelle 6: Erfasste Erkrankungen und Eintragungen im Befundbericht bei der jährlichen zahnmedizinischen Untersuchung des Gesundheitsamtes..... | 33 |
| Tabelle 7: Volumina für die Amplikon-PCR. | 38 |
| Tabelle 8: PCR Bedingungen für die Amplikon PCR..... | 39 |
| Tabelle 9: Planungsbereiche der Stadt mit entsprechenden Stadtteilnamen. | 44 |
| Tabelle 10: Spatial Lag Modell..... | 46 |
| Tabelle 11: Anzahl der reads pro Projekt..... | 47 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| AGI | Akute gastrointestinale Infektion |
| ARI | Akute respiratorische Infektion |
| BIC | Bayesian Information Criterion |
| bp | Basenpaare |
| dmfs/DMFS | decayed missing filed surfaces (zerstörte, fehlende und gefüllte Oberflächen) |
| dmft/DMFT | decayed missing filed teeth (zerstörte, fehlende und gefüllte Zähne) |
| DNA/DNS | Desoxyribonucleid acid/Desoxyribonukleinsäure |
| ECC | Early Childhood Caries (Frühkindliche Karies) |
| EPS | Extrazelluläre Polymere Substanzen |
| FISH | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung |
| GAP | Generalisierte aggressive Parodontitis |
| HMP | Human Microbiome Project (Humanes Mikrobiom Projekt) |
| HOMD | Human Oral Microbiome Database (Humane orale Mikrobiom-Datenbank) |
| ISCED | International Classification of Education |
| LAP | Lokale aggressive Parodontitis |
| LDA | Linear Discriminant Analysis |
| LEfSe | LDA Effect Size |
| MS | Mutans Streptokokken |
| NCBI | National Centre for Biotechnology Information |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| OR | Odds Ratio |
| PCR | Polymerase Chain Reaction/Polymerasekettenreaktion |
| rDNA/rDNS | ribosomale Desoxyribonucleid acid/ribosomale Desoxyribonukleinsäure |
| RDP | Ribosomal Database Project |
| RR | Relatives Risiko |
| SHP | Short Hydrophobic Peptide (kurze hydrophobe Peptide) |
| SIR | Standardisiertes Inzidenz Risiko |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TRIF | Total Internal Reflection Fluorescence |
| QS | Quorum sensing |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Karies und frühkindlicher Karies

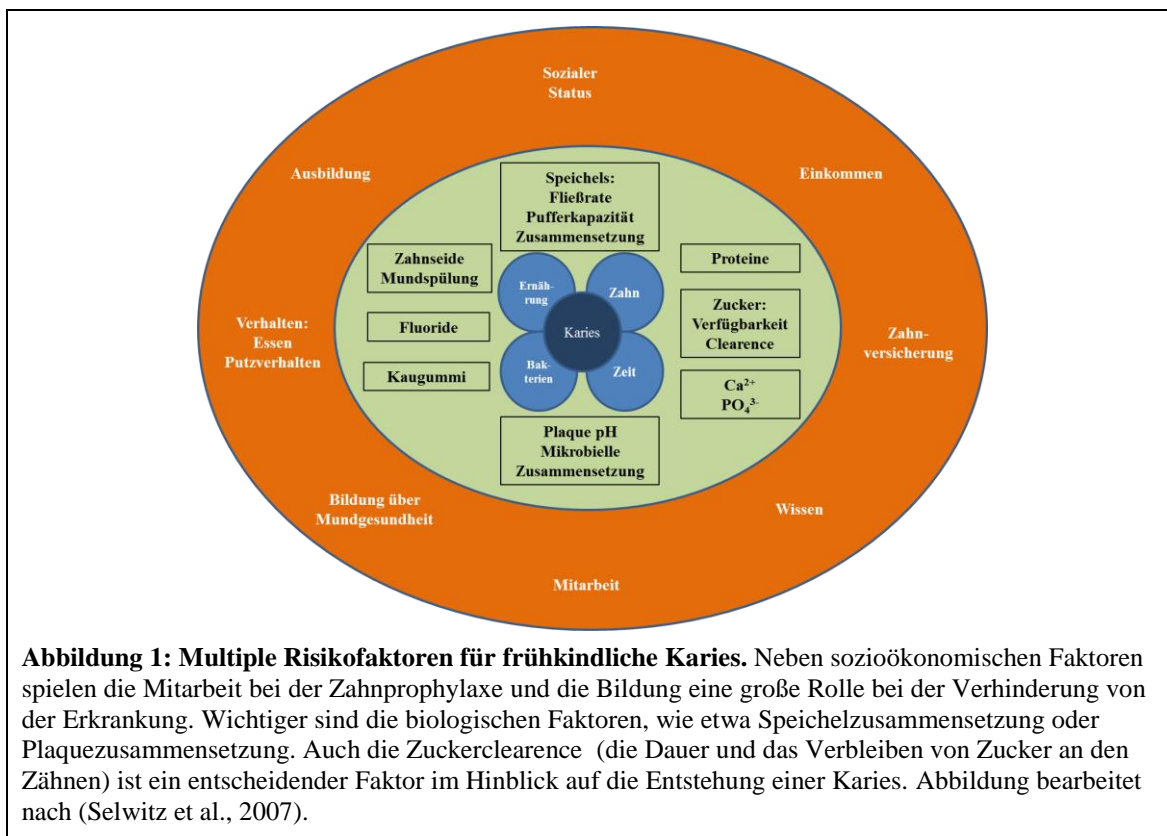
Karies und frühkindliche Karies sind noch immer ein weltweites Problem. Das Bemühen, die Karies bei Erwachsenen und Kindern einzudämmen zeigt in vielen Altersgruppen und über die sozialen Schichten hinweg Erfolge. Dennoch ist die Karies noch immer eine Krankheit, die alle Bevölkerungsschichten betrifft (DMS V, 2016). Die WHO (World Health Organization) hat es sich zum Ziel gesetzt, bis zum Jahre 2020 mindestens 80% der sechs- bis siebenjährigen Kinder in Deutschland mit einem kariesfreien Gebiss zu haben (Ziller et al., 2006). Die aktuellsten Daten zeigen, dass in Deutschland jedes zweite Kind im Alter von sechs Jahren eine Karieserkrankung vorweisen kann (Ziller et al., 2006, Pieper et al., 2009). In Deutschland wird zudem seit 1989 regelmäßig alle zwei bis vier Jahre die Deutsche Mundgesundheitsstudie durchgeführt (DMS), die flächendeckend die Verteilung der Karies für unterschiedliche Altersklassen ab 12 Jahren aufwärts beschreibt. Aktuell haben (je nach Altersklasse) zwischen 10% und 30% der Kinder (>12 Jahre) und erwachsenen Personen aktuell eine Karies oder mussten wegen einer Karies behandelt werden (DMS V, 2016). Hier ist jedoch eine deutliche Verbesserung der Kariesprävalenz im bleibenden Gebiss zu verzeichnen (DMS V, 2016).

Weltweite Zahlen bezüglich der Kariesprävalenz schwanken stark zwischen 30% und 99% etwa in Afghanistan (Myriad, 2009). Die Verlässlichkeit dieser Daten bleibt allerdings fraglich. Der Zahnstatus wird mit verschiedenen Methoden erfasst. Die gängigste ist der dmft-Index (decayed missing filled teeth/zerstörte, fehlende und gefüllte Zähne). Im Falle von Milchzähnen ist die Schreibweise klein, bei bleibenden Zähnen groß (DMFT) (Antunes et al., 2004, Schuller und Holst, 2001). Bei Milchzähnen reicht die Zahl von null bis 20 und gibt somit direkt an, wie viele Zähne befallen sind oder befallen waren von Karies.

1.1.1 Risikofaktoren

Hinsichtlich der Risikofaktoren für die Entstehung einer Karies gibt es zahlreiche Studien (Peng et al., 2014, Bagherian und Sadeghi, 2013, Dos Santos Junior et al., 2014). Diese Risikofaktoren reichen von mangelnder Mund- und Zahnhygiene (kein oder schlechtes Zähneputzen) (de Almeida et al., 2003) über die Mutter-Kind-Übertragung (Mueller et al., 2015, Kowash et al., 2000) bis hin zu soziodemographischen Faktoren (Dos Santos Junior et al., 2014). Nachweislich schlechtere Zähne haben Kinder, die das Zähneputzen vernachlässigen und weniger als zwei Mal täglich die Zähne putzen (RKI, 2008). Auch ein niedriger sozialer Status und

ein Migrationshintergrund sind häufig mit einem schlechteren Zahnstatus korreliert (Colak et al., 2013). Wichtiger als diese „äußeren“ Faktoren sind jedoch die mikrobiologische Zusammensetzung des Biofilms auf den Zähnen, die Zusammensetzung des Speichels, sowie die Fließrate des Speichels, aber auch die Festigkeit des Zahnschmelzes (Colak et al., 2013, Lenander-Lumikari und Loimaranta, 2000). Auch die Ernährung ist ein Risikofaktor für die Entstehung einer Karies (Mattson et al., 2014). Zuckerhaltige Getränke werden als besonders kariogen angesehen, weil die enthaltenen Zucker für ein rasches Wachstum des Biofilms auf den Zähnen sorgen können und hierdurch ebenfalls die Säureproduktion gesteigert wird. Eine Zusammenfassung der genannten Risikofaktoren ist in Abbildung 1 zu sehen.



1.1.2 Studientypen für die Untersuchung von Krankheiten

Um Krankheiten und deren Risikofaktoren zu untersuchen, können verschiedene Studientypen genutzt werden. Die wichtigsten dieser Studientypen sind (1) Kohortenstudien, (2) Fall-Kontroll-Studien und (3) Querschnittsstudien (Gail und Benichou, 2000). Ein wichtiger Teil des Studiendesigns stellen Fragebögen oder Interviews mit den Teilnehmenden dar, die in die Datenerhebung und später in der Datenauswertung mit eingeschlossen werden können. Zu beachten sind bei der Analyse allerdings Störfaktoren (auch Confounder genannt), die häufig zu falschen Aussagen führen können. Typische Confounder sind das Alter, das Geschlecht, oder auch der sozioökonomische Status. So sollte jede statistische Auswertung auch den Test auf mögliche Confounder einbeziehen. Confounding liegt dann vor, wenn die unabhängige

Variable und die Störvariable stochastisch abhängig sind und die Erwartungswerte des Modells mit und ohne Störvariable jeweils unterschiedlich groß sind (Mathis und Gartlehner, 2008). Ebenso wichtig ist es, etwa bei der Untersuchung von Infektionskrankheiten oder bei mikrobiologischen Studien auch Bioproben zu sammeln und diese molekularbiologisch zu untersuchen. Eine Übersicht über die zeitliche Einordnung der Studientypen ist in Abbildung 2 zu sehen.

(1) Kohortenstudien

Kohortenstudien werden auch Längsschnittstudien genannt und verfolgen eine zu untersuchende Population über eine zuvor festgelegte Zeit. Ziel ist es, Exponierte mit nicht-Exponierten bezüglich der Inzidenz (also der Häufigkeit im Auftreten von Krankheiten) zu vergleichen. Ein Sonderfall von Kohortenstudien sind retrospektive Kohortenstudien. Diese Variante findet häufig Anwendung in der Arbeitsepidemiologie oder bei Krankenkassendaten (Mathis und Gartlehner, 2008). Hier werden die Expositionen einer Kohorte aus der Vergangenheit erhoben und anschließend in Verbindung mit dem Auftreten von Krankheiten untersucht. Für die Analyse können im Folgenden dann die Erkrankten der exponierten Gruppe mit denen aus der nicht-exponierten Gruppe verglichen werden. Berechnet werden können dann etwa das Standardisierte Inzidenz Risiko (SIR) und das relative Risiko (RR) zu erkranken. Das SIR ergibt sich aus dem Quotienten von beobachteter und erwarteter Erkrankungszahl, wohingegen das RR der Faktor ist, um den sich die Erkrankungswahrscheinlichkeit unter der Exposition erhöht (oder auch verringert). Kohortenstudien liefern zumeist eine große Datenmenge von hoher Güte. Die zeitliche Sequenz der Erkrankung ist in vielen Fällen gut nachvollziehbar. Nachteilig für diesen Studientyp ist der vergleichsweise hohe zeitliche und finanzielle Aufwand (Mathis und Gartlehner, 2008).

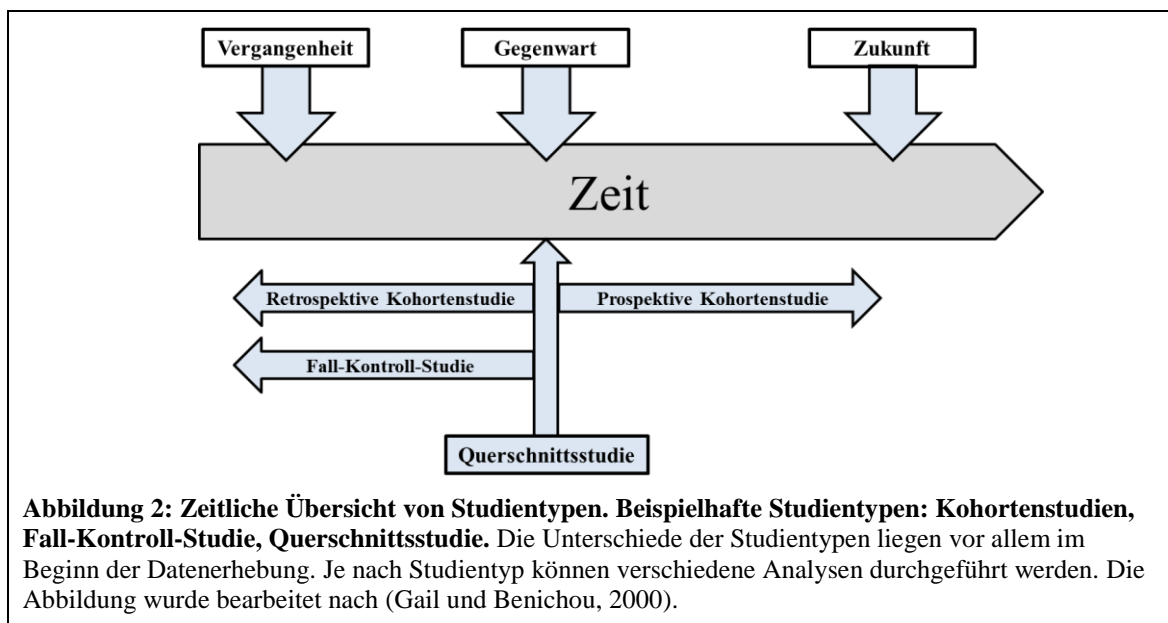
(2) Fall-Kontroll-Studien

Dieser Studientyp dient dem Vergleich von Erkrankten mit nicht Erkrankten bezüglich einer Exposition. Die Rekrutierung der Fälle findet zumeist in Kliniken statt und die der Kontrollen entweder außerhalb oder auch innerhalb der Kliniken. Bei potentiell lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen wird häufig auch eine Rekrutierung über die Meldedaten der örtlichen Gesundheitsbehörden organisiert. Entscheidend bei diesem Studientypus ist die sorgfältige Auswahl der Kontrollen. Die Kontrollen müssen daher gleichen Alters oder Geschlechts sein wie die Fälle. Auch zu beachten ist der Lebensstil und bei lebensmittelbedingten Ausbrüchen das Kaufverhalten von Nahrungsmitteln. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt meist mit Vierfeldertafeln. Das berechnete Maß ist das Odds Ratio (OR) (Bender, 2007). Von der relativen Häufigkeit der Exposition bei Erkrankten bzw. Nicht-Erkrankten kann auf das OR als Schätzer des relativen Risikos für die Erkrankung unter der Exposition geschlossen werden. Vorteilhaft für Fall-Kontroll-Studien ist die Anwendbarkeit für seltene Erkrankungen.

Verglichen mit Kohortenstudien fallen bei Fall-Kontroll-Studien geringere Kosten an. Auch der Zeitaufwand ist als geringer einzuschätzen. Unklar bleibt allerdings häufig die Abfolge von Exposition und Erkrankung. Ein großes Problem ist der sogenannte „Recall-bias“. Häufig erinnern sich die Teilnehmenden nicht oder die Personen der Fallgruppe erinnern sich wesentlich besser an Details als die Personen der Kontrollgruppe. Eine Aussage über die Inzidenz der Erkrankung kann bei diesem Studientyp nicht getroffen werden.

(3) Querschnittsstudien

Die Studienpopulation für Querschnittsstudien ist ein zuvor definierter und ausgewählter Personenkreis, der anschließend auf Exposition und Erkrankung untersucht wird. Die Population wird anhand eines Stichtermins definiert. Der Studientyp eignet sich allerdings nur zur deskriptiven Epidemiologie, weil keine Kausalität hergestellt werden kann. Eine Querschnittsstudie ist mit verhältnismäßig wenig Kosten schnell durchführbar. Oft geben diese Studien Hinweise auf Risikofaktoren für Erkrankungen.



1.2 Das Menschliche Mikrobiom

Der menschliche Körper besteht aus etwa 10^{13} eigenen Zellen und ist von ebenso vielen bakteriellen Zellen besiedelt (Bianconi et al., 2013, Sender et al., 2016). Eine größere Aufmerksamkeit sollte hierbei aber nicht der Tatsache gewidmet werden, dass die Mikroorganismen in gleicher Anzahl auf dem Menschen vorkommen wie die eigenen Zellen, sondern welche Funktion diese erfüllen. Ein Projekt, das ebendieses untersucht, ist das Menschliche Mikrobiomprojekt (Human Microbiome Project/HMP). In einem Teil dieses Projektes wird das kombinierte Metagenom des Menschen und mit diesem in Gemeinschaft lebenden Mikroorganismen untersucht (Human Microbiome Project,

2012). Zahlreiche dieser Studien lieferten auch wichtige Ergebnisse im Hinblick auf die therapeutische Anwendung in der Klinik. So zeigt sich etwa ein Unterschied in der Effizienz der Chemotherapie je nach Zusammensetzung des menschlichen Mikrobioms (Viaud et al., 2013). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Stuhltransplantationen eine wirksame Therapie bei hartnäckigen *Clostridium difficile*-Infektionen darstellen (Rohlke und Stollman, 2012).

Ebenfalls von großer Bedeutung ist es, die bakterielle Zusammensetzung auf und in dem Menschen aus ökologischer Sichtweise zu untersuchen, denn nur auf diese Art und Weise ist es möglich, das Zusammenleben und Verhältnis zueinander zu identifizieren. Hierbei wird das Augenmerk vermehrt auf die Interaktion der Mikroorganismen gelegt, um den Prozess der Homöostase (Gleichgewicht) zu verstehen: Warum bleibt sie bestehen, bzw. warum bleibt sie es in manchen Fällen auch nicht (Peters et al., 2012, Arslan, 2014, Schwabe und Jobin, 2013, Garcia-Castillo et al., 2016)? Diese Fragestellung kann auch auf jegliche Erkrankungen des Mundes bezogen werden. Der Mund ist nach dem menschlichen Verdauungstrakt und im Vergleich mit allen anderen Körperstellen- und Flächen mit der zweitgrößten Artenzahl an Mikroorganismen besiedelt (Group et al., 2009). Aus dieser großen Artenzahl heraus gibt es immer wieder Störungen der Homöostase bis hin zu einer Dysbiose (Ungleichgewicht). Im Falle einer Parodontitis kann eine Dysbiose der oralen Mikroflora gar zu weiteren schwerwiegenden systemischen Krankheiten führen. Hierzu zählen etwa koronare Gefäßerkrankungen oder auch Arthritis (Li et al., 2000, Sampaio-Maia et al., 2016). Eine Zusammenfassung der wichtigsten oralen Erkrankungen und den damit zusammenhängenden Folgen ist in Abbildung 3 dargestellt. In den folgenden Abschnitten wird die mikrobielle Zusammensetzung bei Karies und frühkindlicher Karies gezeigt und die Mechanismen, die zu einer Erkrankung führen, werden näher beleuchtet.

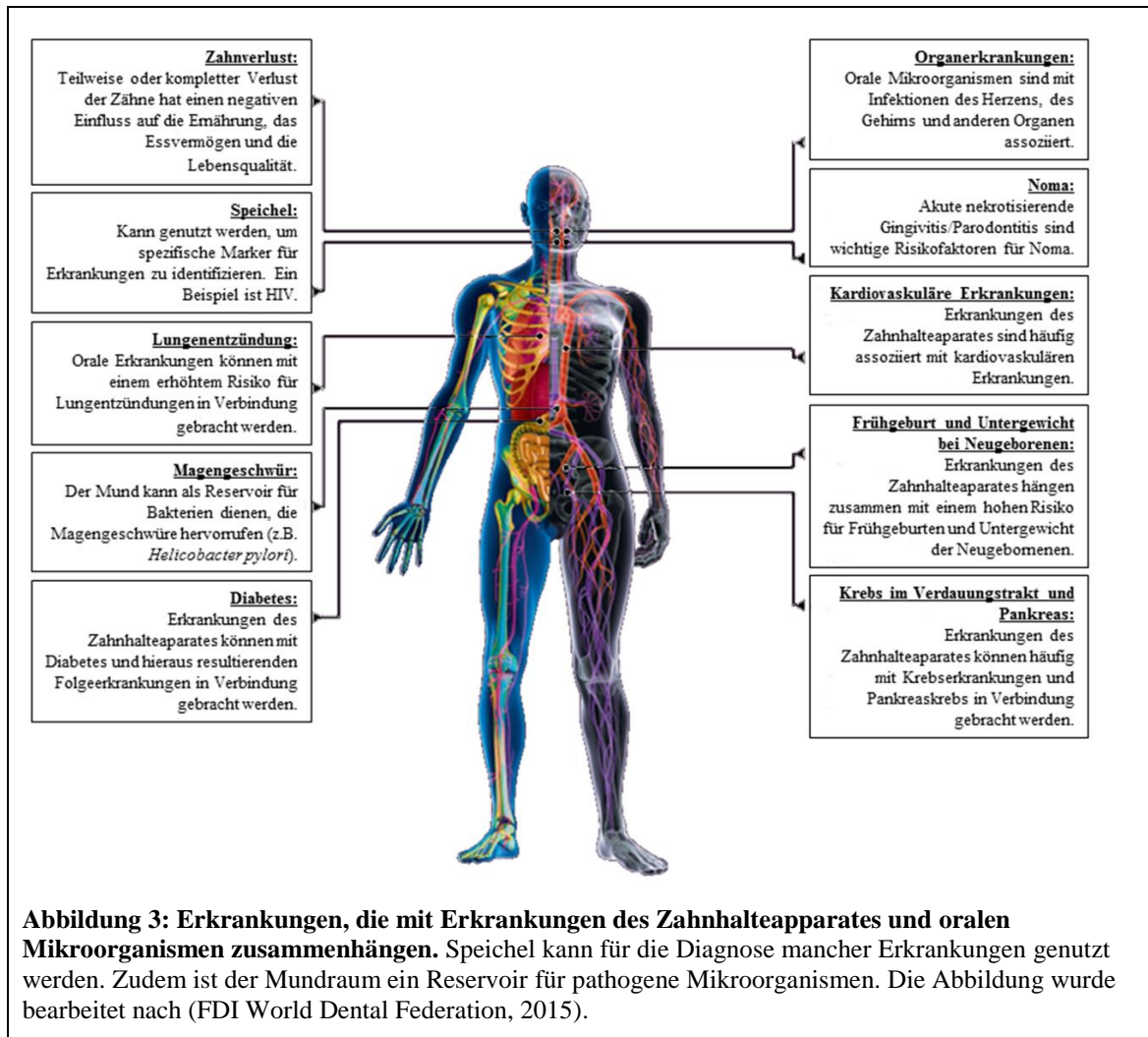


Abbildung 3: Erkrankungen, die mit Erkrankungen des Zahnhalteapparates und oralen Mikroorganismen zusammenhängen. Speichel kann für die Diagnose mancher Erkrankungen genutzt werden. Zudem ist der Mundraum ein Reservoir für pathogene Mikroorganismen. Die Abbildung wurde bearbeitet nach (FDI World Dental Federation, 2015).

1.2.1 Die mikrobielle Mundflora bei gesunden Menschen

Der menschliche Mundraum beherbergt mehr als 600 unterschiedliche Taxa. Die Zusammensetzung der oralen Mikroorganismen ist hochkomplex und beinhaltet nicht nur Bakterien, sondern auch Archaea, Viren, Pilze und Einzeller (Protozoen). Der Nachweis dieser verschiedenen Taxa ist meist nur durch moderne Sequenziermethoden möglich, weil ein Großteil der Mikroorganismen noch nicht-kultivierbar ist (Dewhirst et al., 2010). Die große Anzahl an Mikroorganismen in der menschlichen Mundhöhle ist hauptsächlich durch die unterschiedlichen Umgebungen und ökologischen Nischen erklärbar (Xu et al., 2015). Zu diesen Nischen gehört der Speichel, der seinerseits ein dynamisches System hinsichtlich Zusammensetzung und Fließrate darstellt. Vom Speichel umspült werden die Zähne mit ihrem Zahnschmelz und Zahnfleisch. Auch der Gaumen (sowohl harter Gaumen als auch weicher Gaumen), die Zungenoberfläche und die Backenschleimhäute werden durch den Speichel beeinflusst. Auch zu beachten sind die Mandeln, die mit zu dem Mundraum zählen.

Die wichtigsten Unterschiede der verschiedenen Lebensräume im Mund bestehen in der Sauerstoffverfügbarkeit und dem Nährstoffangebot, dem pH-Wert, der

Oberflächenbeschaffenheit, dem Pellikel (siehe 1.2.1.1) sowie dessen Entstehung und der Exposition gegenüber Scherkräften, die durch den Speichelfluss hervorgerufen werden (Siqueira et al., 2007, Xu et al., 2015). Die Mundhöhle ist sowohl eine lebensfreundliche als auch eine lebensfeindliche Umwelt für die Mikroorganismen. Obwohl viele Menschen mehr als drei Mahlzeiten pro Tag zu sich nehmen, herrscht häufig ein sehr geringes Nahrungsangebot für die oralen Mikroorganismen (Mattson et al., 2014). Es gibt jedoch auch Perioden, in denen genug Nahrung, insbesondere Kohlenhydrate in großen Mengen vorliegen, von denen sich die Mikroorganismen ernähren können. Einige Mikroorganismen können ebenfalls aus dem Speichel Nährstoffe beziehen. Der Speichel dient zwar einerseits dem Schutz der Zähne, beziehungsweise des Zahnschmelzes (etwa durch Remineralisierung), andererseits enthält er aber auch Glykoproteine, Proteine, Eiweiße und Peptide, die verstoffwechselt werden können. Diese Nährstoffe können sich allerdings auch in den Fissuren und Spalten der Zähne ablagern, wo Mikroorganismen direkten Zugriff auf das Angebot haben können. Neben den Nährstoffen enthält der Speichel aber auch noch weitere bioaktive Substanzen. Zu diesen zählen Mucine, Histatine, Lactoperoxidasen, Lactoferrin, Lysozyme, sekretorisches Immunglobulin A und antimikrobielle Eiweiße (Humphrey und Williamson, 2001).

Die Kolonisierung der Mundhöhle beginnt, sobald ein Kind geboren wird. Es ist bekannt, dass die Besiedlung abhängig ist von der Geburtsmethode: natürliche Geburt und Kaiserschnitt. Bei einem Kaiserschnitt können vermehrt Mikroorganismen der Haut im Mundraum gefunden werden, während bei einem auf natürlichem Wege zur Welt gekommenen Kind die vorherrschenden Mikroorganismen der mütterlichen Vagina angetroffen werden (Torres-Alipi et al., 1990, Lif Holgerson et al., 2015). Im späteren Leben gleicht sich die Mikroflora derjenigen der Mutter an, welches hauptsächlich durch eine Mutter-Kind-Übertragung des Speichels beim Anreichen der Nahrung durch die Benutzung desselben Bestecks begründet werden kann (Mueller et al., 2015). Später kommen noch Einflüsse wie etwa Ernährung, Hygiene, Alter, Einnahme von Antibiotika und auch genetische Faktoren hinzu, die über die Zusammensetzung der mikrobiellen Flora entscheiden (Kononen, 2000). Die mikrobielle Flora bei gesunden Kindern ohne Milchzähnen setzt sich aus Bakterien der Gattungen *Leptotrichia*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Neisseria* und *Veillonella* zusammen (XU et al., 2014). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Holgerson et al. (Lif Holgerson et al., 2015). Hier wurden die bakterielle Zusammensetzung der Mundhöhle bei den gleichen Kindern im Alter von drei Monaten und drei Jahren untersucht. *Streptococcus*, *Veillonella* und *Gemella* konnten sowohl bei drei Monate alten Kindern ohne Milchzähne und bei drei Jahre alten Kindern mit Milchzähnen gefunden werden. *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* und *Pseudomonas* waren prävalent bei drei

Monate alten Kindern. Diese Gattungen zeigten keine Prävalenz bei drei Jahre alten Kindern mit Milchzähnen.

1.2.1.1 Das Pellikel

Im Gegensatz zu dem Speichel steht das Pellikel. Das Pellikel ist ein zellenloser Biofilm, der hauptsächlich aus Eiweißen besteht. So enthält es neben Eiweißen auch Mucine aus dem Speichel und dient als Grundlage für die Anheftung der Mikroorganismen an die Zahnoberfläche, also den Zahnschmelz. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit macht erst das Pellikel eine Anheftung der Mikroorganismen an den Zahn möglich, woraus in der Folge polymikrobielle Biofilme entstehen (Hannig und Joiner, 2006, Siqueira et al., 2007, Rabin et al., 2015). Das Pellikel besteht hauptsächlich aus Glykoproteinen des Speichels, Fetten und zu einem geringen Anteil auch aus Bestandteilen der Spaltflüssigkeit des Zahnfleisches (Bradway et al., 1989, Hannig und Joiner, 2006). Die Kolonisierung der Zahnoberfläche kann nur durch die bakterielle Anheftung an die Oberfläche, also das Pellikel stattfinden. Die Anheftung ist ein komplexer Prozess, der noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Die Anheftung der Mikroorganismen an das Pellikel gelingt sowohl über physikalische und im späteren Stadium auch über chemische Prozesse (Whittaker et al., 1996, Hannig und Hannig, 2009, Huang et al., 2011). Zu den ersten Bakterien zählen Bakterien der Gattung *Streptococcus* (Li et al., 2004). Vor allem weil die Anheftung auch ein Selektionsprozess ist, besitzen vor allem die ersten Kolonisierer Mechanismen, die die Oberfläche erkennen können. Diese Moleküle werden Adhäsine genannt und binden an Rezeptorstellen des Pellikels. Einige dieser Rezeptoren sind Oligosaccharide (Vielfachzucker), die an das Proteinrückrat der Glykoproteine des Pellikels binden (Gibbons et al., 1986). Derartige Rezeptoren sind absolut notwendig für die Kolonisierung und durch die Spezifität der Rezeptoren wird es erst möglich gemacht, dass oben genannte Streptokokken die ersten Bakterien sind, die an das Pellikel binden können.

1.2.1.2 Die Zahnplaque als polymikrobieller Biofilm

Die Zahnplaque ist ein polymikrobieller Biofilm auf den Zähnen und benötigt die Bindestellen des Pellikels, um an den Zahnoberflächen anhaften zu können (Hannig und Joiner, 2006). Die Zähne sind bereits wenige Sekunden nach der Zahnreinigung von dem Pellikel bedeckt. Mikroorganismen können nicht direkt an den glatten Zahnschmelz, der mineralisierten Zahnhartsubstanz, anhaften. An das Pellikel können sich andere Mikroorganismen anlagern und einen Biofilm, auch Plaque oder Zahnplaque genannt, bilden (Saini et al., 2011). Zu den frühesten Besiedlern gehören vorwiegend Bakterien der Genera *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella* und *Neisseria* (Diaz et al., 2006, Zijnga et al., 2013). Durch das Wachstum des Biofilms kommen immer mehr Bindestellen für die sogenannten späten Besiedler hinzu (Kolenbrander et

al., 2010, Langfeldt et al., 2014). Der Biofilm auf der Zahnoberfläche besteht allerdings nicht ausschließlich aus Mikroorganismen, sondern auch aus Extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Diese Substanzen werden von nahezu allen Mikroorganismen produziert und ausgeschieden (Flemming et al., 2007). Die EPS sind eine Mischung aus Mehrfachzuckern, Eiweißen, Nukleinsäuren und Fetten (Flemming et al., 2007). Die EPS schafft eine Struktur für die Mikroorganismen, sodass diese in dem Biofilm vor dem menschlichen Immunsystem und sogar vor Antibiotika geschützt werden (Bjarnsholt, 2013). Der einzige Weg diese Biofilme effizient zu entfernen, ist das Zähneputzen oder die professionelle Zahnreinigung beim Zahnarzt. Trotz gründlichster Reinigung bleiben jedoch Reste der Plaque auf den Zahnoberflächen zurück. Durch Kalziumphosphate, die natürliche Inhaltsstoffe des menschlichen Speichels darstellen und den Remineralisierungsprozess des Zahnschmelz unterstützen (Lenander-Lumikari und Loimaranta, 2000), kann allerdings die Zahnplaque dauerhaft mineralisiert werden. Hierdurch erfährt sie eine Umwandlung von Zahnplaque in Zahnstein, eine weitaus härtere Substanz, die neben Calciumphosphat auch Überreste von Mikroorganismen enthalten kann (Jepsen et al., 2011). Zahnplaque und Zahnstein können sowohl subgingival (unterhalb des Zahnfleisches), als auch supragingival (oberhalb des Zahnfleisches) auftreten. In beiden Fällen ist es jedoch möglich, dass Infektionen entstehen, seien es Infektionen des Zahnfleisch oder aber der Zähne (Pihlstrom et al., 2005, Pugach et al., 2009). Entzündetes Zahnfleisch kann zu Parodontitis führen und infizierte Zähne können nach dem Verlust des Zahnschmelzes zu einem zerstörten Dentin und folglich zu Karies führen (Selwitz et al., 2007). Die Entstehung und Zusammensetzung des supragingivalen Biofilms ist in Abbildung 4A schematisch dargestellt.

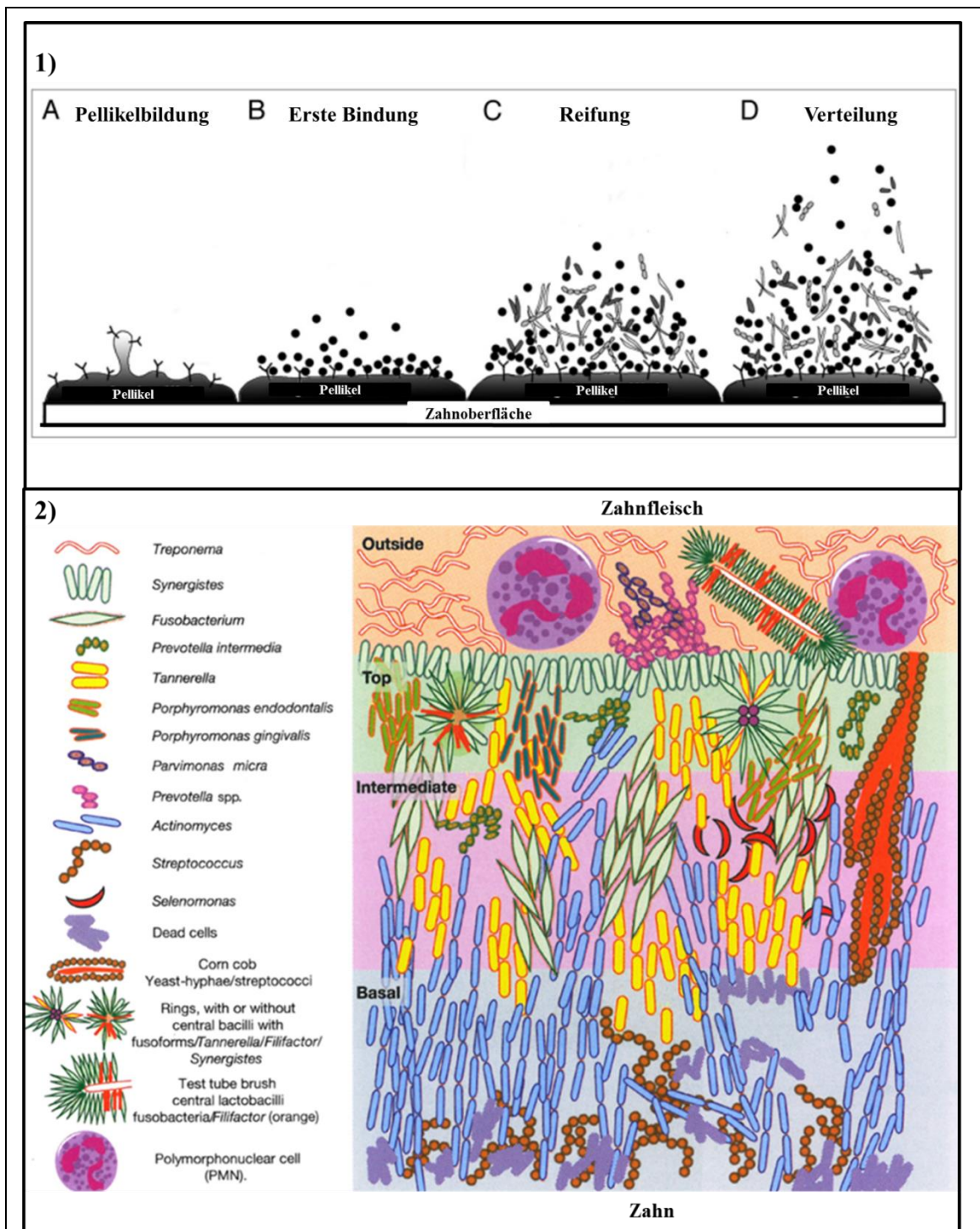


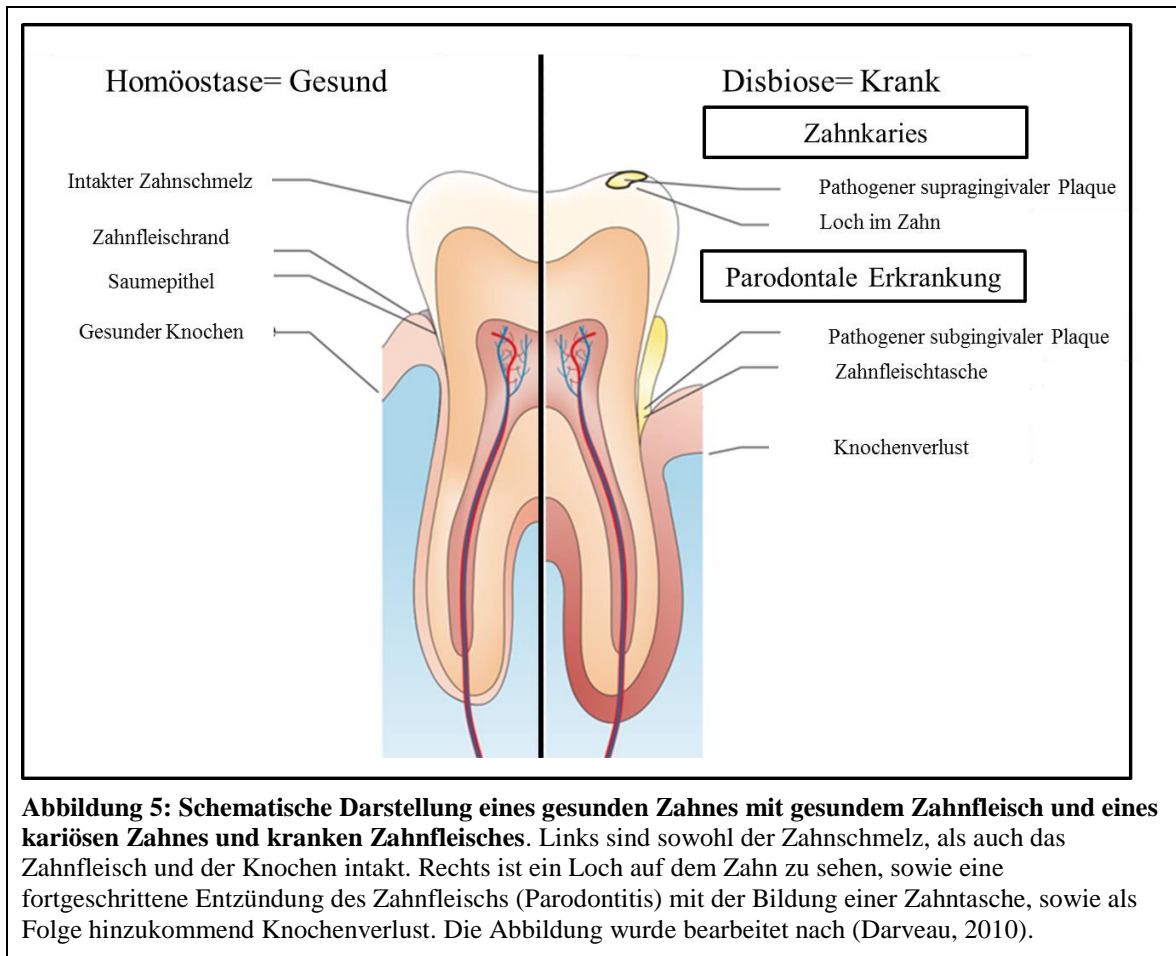
Abbildung 4: Schematische Bildung eines Biofilms auf der Zahnoberfläche. 1) Zunächst liegt nach einer Zahnreinigung nur das Pellikel auf der Zahnoberfläche vor (A). Die initiale Bindung von Mikroorganismen ist der zweite Schritt (B). Hieran sind hauptsächlich Bakterien der Gattung *Streptococcus* beteiligt. In der Phase der Reifung (C) binden weitere Mikroorganismen an die bereits vorhandenen Zellen. Organische Substanzen wie Eiweiße, aber auch anorganische Substanzen, etwa Kalziumphosphate, werden in den Biofilm eingelagert. Hat der Biofilm eine kritische Größe erreicht, so kommt es zur Ablösung von einzelnen Fragmenten des Biofilms (D). 2) Schematisches Modell eines gereiften Zahnbiofilms. Der Biofilm besteht aus drei unterschiedlichen Lagen mit einer losen äußeren Schicht. Es ist gut zu erkennen, dass Streptokokken die Grundlage des Biofilms bilden. Die Abbildung wurde bearbeitet nach (Huang et al., 2011) (1) und (Zijnge et al., 2013) (2)).

Typische Strukturen des Biofilms sehen bei hoher Auflösung ähnlich aus wie Maiskolben- etwa Pilzhyphen, die überzogen sind mit Streptokokken- oder aber wie Bürsten- gebildet durch Laktobazillen, Fusobakterien und Arten der Gattung *Filifactor*. *Synergistetes* können Strukturen bilden, die ähnlich aussehen wie Palisaden (Zijnge et al., 2010). Häufig werden diese Strukturen nah am Zahnfleischrand gebildet. Hieraus lässt sich deutlich erkennen, dass Biofilme keine homogenen Strukturen sind, sondern vielmehr heterogen und polymorph auftreten können. Orale Biofilme bestehen aus einer Vielzahl miteinander zusammenhängender Mikroorganismen, die aneinander gebunden sind und komplexe Strukturen bilden können (Zijnge et al., 2010) (Abbildung 4B).

Zusammengefasst bedeutet das, dass nach jeder mechanischen Entfernung der Zahnplaque (Zähneputzen oder professionelle Zahnreinigung) bereits der Prozess der Rekolonisierung beginnt. Hierbei spielen verschiedene Mikroorganismen eine wichtige Rolle bei der Bildung eines vielschichtigen Biofilms. Das gesunde Gleichgewicht- häufig auch Homöostase genannt- wird hauptsächlich über eine entsprechende Mundhygiene reguliert. Der nächste Abschnitt befasst sich mit den einzelnen Mechanismen, die für die Entwicklung und das Fortschreiten oraler Erkrankungen zuständig sind.

1.2.2 Erkrankungen der Zähne und des Zahnhalteapparates

Unter normalen Umständen herrscht ein Gleichgewicht (Homöostase) zwischen dem Wirt und den Mikroorganismen des Mundraumes. Diese Homöostase kann unter Umständen in ein Ungleichgewicht (Dysbiose) umschlagen und in der Folge zu Erkrankungen führen. Sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Dispositionen sind mitwirkend in dem Wandel von „gesund“ zu „krank“. Interessanterweise finden die Koch'schen Postulate (ein Erreger ist verantwortlich für die Übertragung und Auslösung von Krankheiten) bei Krankheiten, die durch orale Biofilme hervorgerufen werden, keine Anwendung. Das Besondere hierbei ist, dass die Erkrankungen nicht durch einen Mikroorganismus alleine, sondern durch das Zusammenwirken vieler hervorgerufen werden. In Abbildung 5 werden zwei typische polymikrobielle orale Infektionen dargestellt: Zahnkaries und Parodontitis.

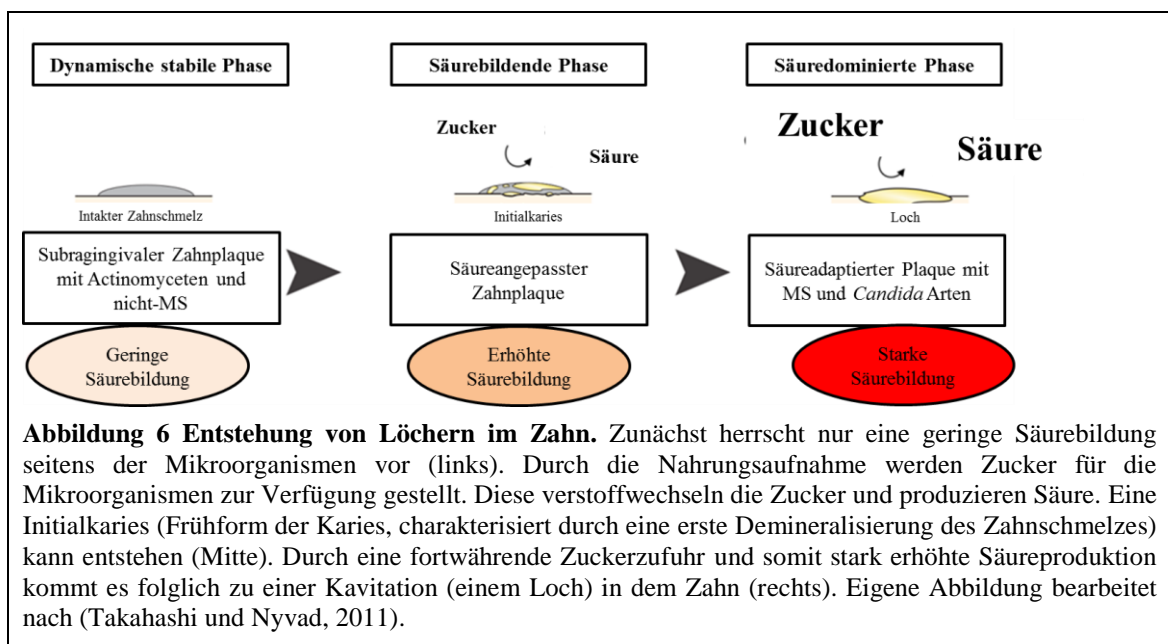


1.2.2.1 Karies

Karies ist die häufigste Erkrankung bei allen Menschen weltweit. Mehr als 2.3 Mrd. Personen leiden sowohl in Industrieländern, als auch in Entwicklungsländern unter dieser Zerstörung der Zähne (Kassebaum et al., 2015). Während der Anteil der Personen mit Karies in Industrieländern leicht rückgängig ist, so nimmt der Anteil an Personen mit Karies in Entwicklungsländern weiter zu (Bagramian et al., 2009). Verlässliche Daten, die eine weltweite Verteilung der Karies beschreiben, sind nicht existent. Dies mag sowohl an der fehlenden Berichterstattung seitens der Länder liegen als auch an den fehlenden einheitlichen Erfassungsmaßstäben.

Die Entstehung und Entwicklung von Karies ist in Abbildung 6 schematisch gezeigt. Die Karies ist eine bakterielle Erkrankung und ein fortlaufender Prozess, der auf einer ungenügenden Mundhygiene beruht. Empfohlen wird mindestens zweimaliges Zähneputzen pro Tag, damit eine potentiell pathogene Zahnplaque auf den Zähnen entfernt wird. Wird die Zahnplaque nicht regelmäßig entfernt, so werden Säuren produziert und durch den pH-Abfall ($\text{pH} < 6,8$) wird in der Folge der Zahnschmelz demineralisiert. Zahnschmelz gilt als die härteste Substanz im menschlichen Körper und besteht zu 97% aus mineralischen Anteilen (Hydroxylapatit) (Dorozhkin und Epple, 2002). Säuren sind in der Lage den Zahnschmelz zu demineralisieren. Bei einer

Demineralisierung, die durch die bakterielle Säureproduktion ausgelöst wird, entsteht eine Karies. Bei Defekten die ausschließlich den Zahnschmelz betreffen, spricht man von einer Initialkaries, die bei frühzeitiger Diagnose reversibel ist (Selwitz et al., 2007). Bei einem Fortschreiten kommt es zu der Zerstörung des wesentlich weicheren Zahnbeines, das aus etwa 50% organischen Bestandteilen (hauptsächlich Kollagen) besteht (Marshall, 1993). Das Zahnbein ist der letzte Schutz des Zahnnervs. Bei seinem Befall kann der Zahn absterben. Es sind verschiedene Formen der Karies bekannt, die entweder deutlich sichtbar fortschreiten können oder sich an Stellen befinden, die nicht man nicht erkennen kann und auf diesem Wege zu einer Wurzelkaries (Apikalkaries) und einem hiermit verbundenen Befall des Zahnnervs führen und in der Folge zu Zahnausfall führen können (Ismail, 1997, Fure und Zickert, 1990) (Abbildung 7).



Auslöser der Karies sind Bakterien. Die ökologische Karieshypothese besagt, dass sowohl in gesundem wie in kariösem Zustand die gleichen Mikroorganismen gefunden werden können. Der Unterschied zwischen kariösen und gesunden Zähnen liegt in der Anreicherung der säureproduzierenden und säureresistenten Mikroorganismen. Diese Anreicherung folgt aus einer kohlenhydratreichen oder zuckerhaltigen Nahrung, die zu einer erhöhten Säureproduktion der Zahnplaque führt (Kilian et al. 2016). Die Folge ist ein Abfall des pH-Wertes (Takahashi und Nyvad, 2011). Dieser Abfall ist direkt verantwortlich für die Demineralisierung der Zahnartsubstanz, dem Zahnschmelz, und führt im Weiteren zu einer initialen und reversiblen Kariesform (sogenannte Schmelzkaries) und bei Nichtbehandlung zu einem Fortschreiten der Karies bis hin zur vollständigen Zerstörung des Zahnbeins (Richards et al., 2005, Featherstone, 2008). Ferner spielen genetische Faktoren des Wirtes eine wichtige Rolle in der Kariesprogression. Liegt etwa eine Mutation in einem der Gene, die für die Schmelzformation wichtig sind (*ameloblastin*, *amelogenin*, *enamelin*, *tuftelin 1* and *tuftelin interacting protein 11*) vor, so werden die Zähne schneller abgenutzt (Erosion),

als bei Personen ohne eine derartige Mutation (Patir et al. 2008, Søvik et al., 2015). Auch eine einfache Vervielfältigung eines Nucleotids im zuständigen Gen für das Enzym Lactotransferrin (ein Protein im menschlichen Speichel mit antibakterieller Aktivität) kann *S. mutans* und andere orale Mikroorganismen effektiv abtöten (Fine et al., 2013). Entgegen der ökologischen Karieshypothese steht noch immer die Vermutung, dass *Streptococcus mutans* hauptverantwortlich für die Karies ist (Forssten et al., 2010).

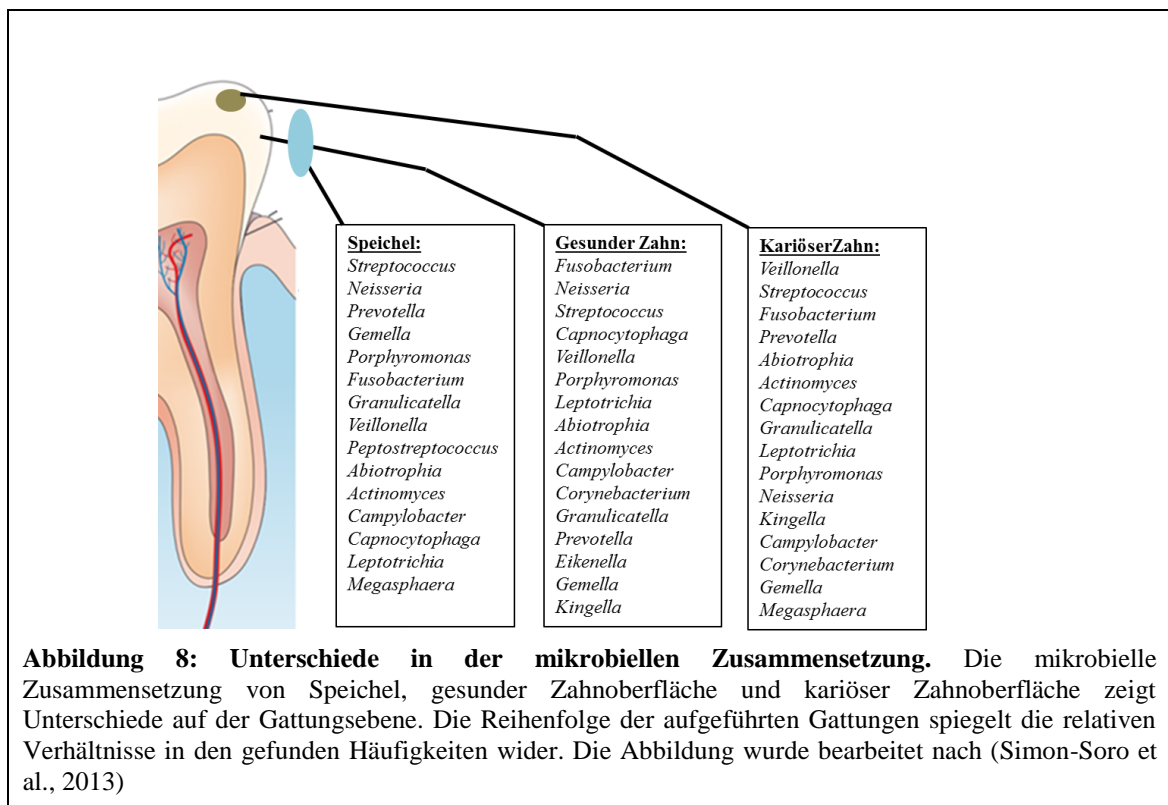
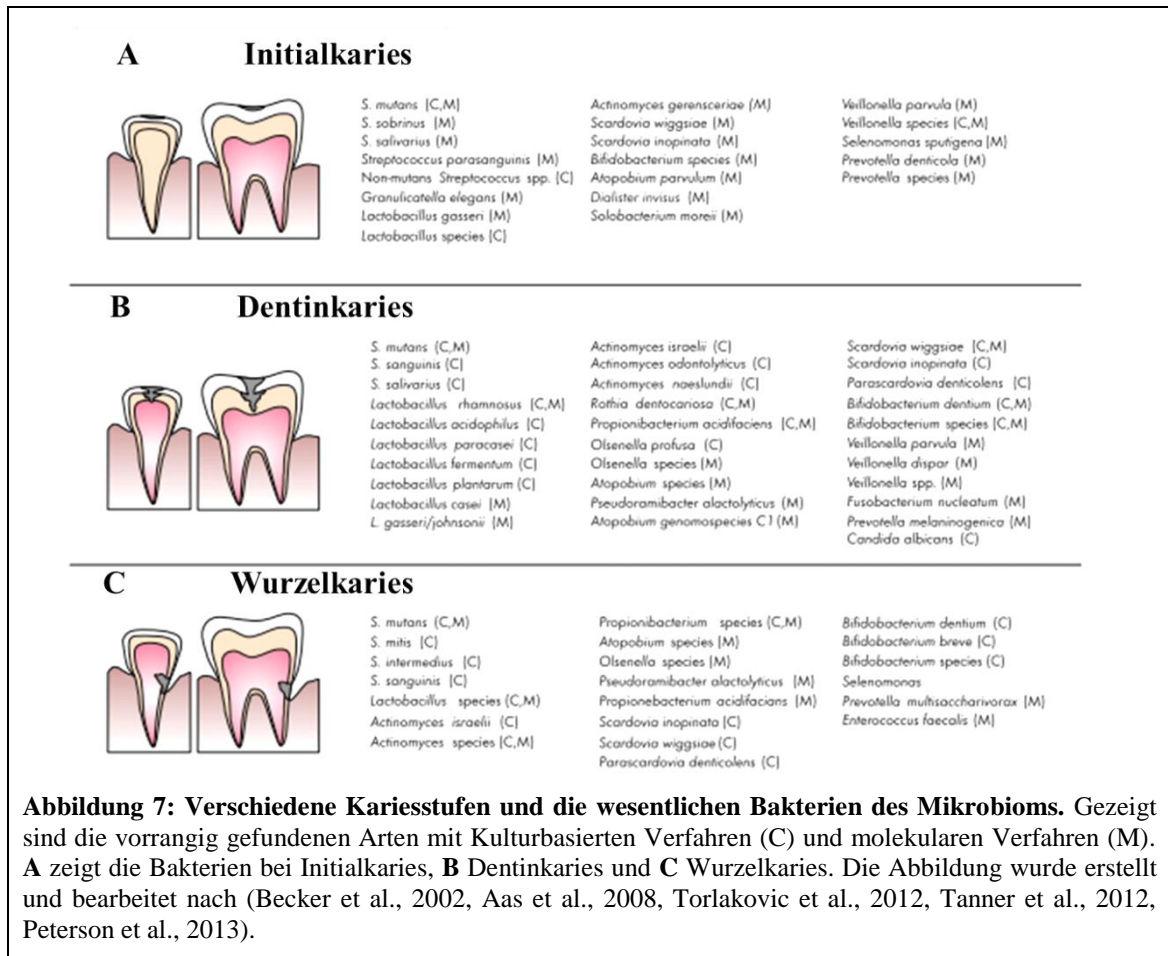
S. mutans ist selbst säuretolerant und gleichfalls ein Säureproduzent. Ferner kann es Bakteriozine produzieren und Biofilme bilden. Bakteriozine sind Substanzen, die artverwandte Bakterien abtöten. Jedoch zeigten mehrere Studien, dass nicht bei jeder Läsion *S. mutans* vorgefunden werden konnte, beziehungsweise auch bei gesunden Menschen dieses Bakterium gefunden werden konnte (Gilbert et al., 2014). Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass *S. mutans* eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Karies spielt, vor allem, weil es als EPS-Produzent eine wichtige Grundlage für weitere kariogene Mikroorganismen schaffen kann (Koo et al., 2013).

Die kommensalen Mikroorganismen der gesunden Zahnplaque enthalten in der Regel eine Vielzahl an Streptokokken (zum Bspl. *S. mitis*, *S. oralis*, *S. Sanguinis*) und ebenso Aktinomyzeten (Takahashi und Nyvad, 2011). Von diesen Mikroorganismen geht bei einer nicht-pathogenen Zahnplaque eine relativ milde und unbedeutende Säureproduktion aus. Sobald allerdings Zucker aus der Nahrung für die Bakterien zur Verfügung stehen, so beginnt eine Stoffwechselkaskade, die in einer stark erhöhten Säureproduktion endet. Hierdurch werden säurebildende und säureresistente Bakterien selektiert. Als Folge von andauernder und starker Belastung durch Säure auf den Zähnen können säuretolerante Mikroorganismen, wie etwa Mutans Streptokokken (MS), zum Bspl. *S. mutans* und *S. sobrinus*, aber auch Laktobazillen und Hefen (verschiedene *Candida*-Arten) die Oberhand gewinnen. Durch die Dominanz dieser Arten und fortwährender Säureproduktion kann die Zerstörung des Zahnes problemlos fortschreiten (Touger-Decker und van Loveren, 2003).

Peterson *et al.* konnten zeigen, dass die mikrobiologische Zusammensetzung und Abundanz der Zahnplaque bei gesunden Zähnen ähnlich zu der Zusammensetzung bei kariösen Zähnen ist (Peterson et al., 2013). So wurden zwei Streptokokken-Arten sowohl bei Karies als auch bei gesunden Zähnen besonders häufig gefunden: *Streptococcus mitis* und *Streptococcus sanguinis*. Neben diesen beiden Arten wurden ebenfalls folgende Arten besonders häufig identifiziert: *Veillonella parvula*, *Streptococcus oralis*, *Neisseria subflava*, *Gemella haemolysans*, *Granulicatella elegans*, *Streptococcus gordonii*, *Abiotrophia defectiva*, *S. cristatus*, *Campylobacter. gracilis*, *C. showae*, *S. infantis*, *S. constellatus*, *S. mutans* und *C. concisus*. Auf Gattungsebene zeigte sich eine Dominanz der Streptokokken, die mehr als 50% der Zahnplaque ausmachten. Die nächsthäufigen Gattungen waren zu weniger als 10% aber zu mehr als

1% in der Zahnplaque vertreten: *Veillonella*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Campylobacter*, *Gemella*, *Abiotrophia*, *Selenomonas* und *Capnocytophaga*.

Die Unterschiede in der bakteriellen Zusammensetzung zwischen einer kariösen Plaque und einer Plaque auf gesunden Zähnen zeigte sich vorwiegend bei den Arten und Gattungen, die gering abundant waren. Bei Gattungen, die sowohl in Proben von kariösen als auch in Proben von nicht-kariösen Zähnen sehr häufig und häufig gefunden wurden, zeigten sich nur geringe oder keine Unterschiede in der Zusammensetzung. Ausnahmen bildeten hier die Gattungen *Streptococcus*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Neisseria*, *Actinomyces* und *Eubacterium*. Alle sechs Gattungen waren häufiger in Proben von kariösen Zähnen vertreten. Größer waren jedoch die Unterschiede bei den gering-abundanten Gattungen. Hier zeigte sich eine große Variabilität beim Vergleich der zwei Gruppen (Karies vs. Kein Karies) (Peterson et al., 2013, Simon-Soro et al., 2013). Eine weitere Studie erfasste neben den Mikroorganismen auch den pH Wert. Sofern der pH Wert niedrig ist, so war die Diversität ebenfalls niedriger als bei höheren Werten, also bei Karies. Zudem wurden die Biofilme dominiert von Laktobazillen. Zu ebendiesem Ergebnis kamen auch weitere Studien, die zudem vermehrt *Prevotella* und *Bifidobacterium* bei Dentinkaries beschrieben (Mantazourani et al., 2009, Kianoush et al., 2014). In Abbildung 7 sind die verschiedenen Stadien der Karies mit den entsprechend assoziierten Mikroorganismen gezeigt. In Abbildung 8 sind die unterschiedlichen Gattungen gezeigt, die im Speichel und in der Zahnplaque bei gesunden Probanden gefunden werden konnten, sowie die Mikroorganismen, die auf einer kariösen Zahnoberfläche gefunden werden konnten.



1.2.2.2 Frühkindliche Karies

Die Datenlage bei ECC zeigte sich als spärlich im Vergleich zu der bei bleibenden Zähnen. Insbesondere vergleichende Arbeiten, die auf die mikrobielle Zusammensetzung der Zahnplaque im Säuglingsalter (nach Durchbruch der ersten Zähne) und im Alter von sechs Jahren eingehen, sind nicht vorhanden.

Frühkindliche Karies (early childhood caries/ECC) zählt zu den 10 häufigsten Erkrankungen im Kindesalter (Global burden of disease, injury & prevalence, 2016). Laut Definition ist mindestens ein Milchzahn von Karies befallen (Dentistry, 2008). Charakteristisch für diese Art der Karies ist das schnelle Fortschreiten nach der Initiation (Colak et al., 2013). So kann ECC innerhalb von wenigen Tagen zu einer vollständigen Zerstörung des Zahns führen, wohingegen eine Karies an bleibenden Zähnen auch über mehrere Jahre hinweg unbemerkt bleiben kann. Der Prozess verläuft ähnlich wie bei der Karies an bleibenden Zähnen: Nach der initialen Kariesform, die noch reversibel ist, kommt es durch zunehmende Säureproduktion zu einem Abbau des Zahnschmelzes und in der Folge einem Angriff auf das Zahnbein. Interessanterweise sind bei der frühkindlichen Karies häufig zunächst die oberen Frontschneidezähne betroffen. Dies liegt an der besonderen Exposition und der Lage der Speicheldrüsen. Während die Zähne des Unterkiefers noch genug von Speichel umspült werden und entsprechende Remineralisierung erfahren können, ist dies bei den oberen Frontschneidezähnen nicht möglich. Somit kann nach Zuckerzufuhr der Milchzahn von den Säuren der Bakterien (die aus ebendiesen Zuckern produziert werden) zerstört werden. Vorausgesetzt sind natürlich eine mangelnde Mund- und Zahnhygiene, sowie häufig zuckerhaltige Getränke (Selwitz et al., 2007). Da diese Getränke häufig in Nuckelflaschen verabreicht werden, wird ECC auch als Nuckelflaschenkaries bezeichnet. Eine Bewertung der Schwere wird häufig nach dem System von Wyne vorgenommen (Wyne, 1999). Hier wird die Karieserkrankung in drei Typen eingeteilt. Während Typ I ECC eine moderate Kariesform mit wenigen kariösen Läsionen (zumeist der oberen Frontschneidezähne) darstellt und häufig noch reversibel ist, stellt Typ II ECC bereits eine deutlich gravierendere Form der Erkrankung dar. So sind bei dieser Form neben den oberen Frontschneidezähnen auch vermehrt Eck- und Backenzähne des Oberkiefers betroffen. Typ III ECC stellt die schwerste Form der Erkrankung dar. Hier sind neben den gesamten Zähnen des Oberkiefers zusätzlich die Unterkieferschneidezähne befallen (Wyne, 1999).

Wie bereits unter 1.2.1 erwähnt, ist der Geburtsweg der Kinder (natürliche Geburt vs. Kaiserschnitt) ausschlaggebend für die früheste Zusammensetzung der oralen Flora. Im späteren Leben kommen noch die Übertragung von Mikroorganismen seitens der Eltern, sowie von anderen Mitmenschen hinzu (Hajshengallis et al., 2016). Neben Gemeinsamkeiten der mikrobiellen Zusammensetzung bei Karies an bleibenden Zähnen, sowie an Milchzähnen gibt es auch Unterschiede in der mikrobiellen

Zusammensetzung (As et al., 2008). Diese Arbeit ist bis dato der einzige Vergleich der mikrobiellen Plaquezusammensetzung bei kariösen Zähnen von erwachsenen Personen und Milchzähnen von Kindern: Die isolierte mikrobielle DNA wurde mit Hilfe von Klonierungsmethoden vervielfältigt und anschließend sequenziert (NGS). Bei einer Karies an bleibenden Zähnen wurde im Vergleich mit Karies an Milchzähnen eine höhere bakterielle Diversität gefunden. *Streptococcus parasanguinis* und *Streptococcus salivarius* wurden sowohl bei Karies an bleibenden Zähnen, als auch bei ECC gefunden. Bei ECC waren vor allem *Corynebacterium* sp. und *Actinomyces gerencseriae* vorherrschende Arten. Demgegenüber zeigte sich bei Karies an bleibenden Zähnen eine Dominanz von *Leptotrichia* sp., *Campylobacter gracilis*, und *Selenomonas* sp.. Die bakterielle Zusammensetzung wurde außerdem bei einer stark fortgeschrittenen Karies untersucht. Hier war auffällig, dass bei ECC neben *S. mutans* noch *Lactobacillus* sp., *Propionibacterium* sp. und *Bifidobacterium* sp. vorherrschend waren. Die gleichen Arten wurden bei Karies an bleibenden Zähnen identifiziert mit dem Unterschied, dass hier nicht *Bifidobacterium* sp., sondern *Atopobium genomospecies* gefunden wurde (Aas et al., 2008).

Weitere Studien zeigten, dass neben der bakteriellen Zusammensetzung der Zahnplaque, die hauptsächlich aus *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Neisseria*, *Gemella* und *Veillonella* besteht, insbesondere *Veillonella* abundanter bei ECC als bei gesunden Zähnen ist (Peterson et al., 2013, Diaz et al., 2012). Während Diaz et al. bereits die NGS-Technologie verwendet haben, wurde bei Peterson et al. mit klonaler Amplifikation gearbeitet. Wichtig ist zu erwähnen, dass diese Mikroorganismen auch bei einer gesunden Mundflora gefunden werden können, es also nicht geklärt ist, ob diese Bakterien tatsächlich an der Entstehung beteiligt sind, oder nur als Folge dieser vermehrt vorgefunden werden können. Die fortschreitende Entwicklung von Nachweistechnologien von Mikroorganismen (wie zum Beispiel NGS) führte zudem zu der Annahme eines sogenannten core-Mikrobioms, also einer bakteriellen Zusammensetzung, die unabhängig von einer Erkrankung, dem Alter oder dem Geschlecht gefunden werden kann. Hierzu zählen *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Prevotella* und *Capnocytophaga* (Zaura et al., 2009). Bei fortschreitender ECC wurden vermehrt Gram positive und fakultativ anaerobe Bakterien (zum Beispiel Streptokokken) und mehrere Laktobazillen- Arten gefunden. Demgegenüber stehen Gram negative und obligat anaerobe Bakterien, die vermehrt bei gesunden Probanden identifiziert wurden (Marsh und Martin, 2009). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zusammensetzung und der Stoffwechsel von oralen Bakterien abhängig von der jeweiligen Region der Mundhöhle sind. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei einer Karieserkrankung zu einer Verschiebung der bakteriellen Zusammensetzung kommt. Zwar konnten die Arten, die mit Karies in Verbindung gebracht werden, auch

bei gesunden Probanden gefunden werden, allerdings ist hier die Anzahl und Häufigkeit dieser als nicht klinisch relevant anzusehen (van Winkelhoff und Boutaga, 2005). Hieraus schlussfolgernd ist ECC keine Infektionskrankheit, sondern begründet durch eine pathogene polymikrobielle Plaque, die in der Lage ist Säuren zu produzieren. Neben Bakterien konnten aber auch Hefeformen von Pilzen isoliert werden (Dupuy et al., 2014, Zijnga et al., 2010, Raja et al., 2010). Ein wichtiger Pilz ist hierbei *Candida albicans* der Interaktionen mit anderen oralen Mikroorganismen, wie zum Beispiel *S. mutans* eingehen kann (Sztajer et al., 2014, Hajshengallis et al., 2016).

Neueste Studien zeigen, dass sich das orale Mikrobiom bei Kindern über die Jahre hinweg entwickelt und eine große Dynamik aufweist (Lif Holgerson et al., 2015). So sind sowohl bei drei Monate alten Kleinkindern, als auch bei drei Jahre alten Kindern noch die Phyla Bacteroidetes, Firmicutes und Proteobacteria zu finden, Actinobacteria, Fusobacteria, TM7 und SR1 jedoch vermehrt erst bei den Dreijährigen. Bei Betrachtung der vorkommenden Genera sind es vor allem *Bergeyella*, *Porphyromonas*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Aggregatibacter*, *Corynebacterium*, *Abiotrophia*, *Kingella* und *Lautropia*, die bei den Dreijährigen vorzufinden sind, bei den drei Monate alten Kleinkindern jedoch nicht (Lif Holgerson et al., 2015). Dieselbe Studie beschreibt diese Unterschiede auch auf Artebene. Auffällig hierbei ist es, dass vor allem *Neisseria elongata* einzig bei allen drei Jahre alten Kindern nachgewiesen werden konnte, aber nicht bei den drei Monate alten Kindern.

Andere Untersuchungen gehen sogar so weit, dass aus der bakteriellen Zusammensetzung im Kleinkindalter vorhergesagt werden kann, ob sich später hieraus eine Karies entwickeln kann oder nicht (Teng et al., 2015). In dieser Studie wurden 50 Kinder im Alter von vier Jahren über einen Zeitraum von zwei Jahren verfolgt. Durch das regelmäßige Sammeln von Proben und Feststellen des Zahnstatus konnte ein Modell mit hoher Aussagekraft (AUC=0.77) erstellt werden, dass ECC auf Grundlage der mikrobiellen Zusammensetzung der Plaque und des Speichels vorhersagen kann. Zu Beginn der Studie wurden drei Gruppen (auf Grundlage des vorherrschenden Zahnstatus) definiert. Neben einer Gruppe mit gesunden Probanden ohne zerstörte Oberflächen (dmfs [decayed missing filled surfaces]=0) wurden die übrigen Probanden in zwei Gruppen mit Karies (geringe Karies [$1 \leq \text{dmfs} < 6$] und schwere Karies [$\text{dmfs} \geq 6$]) eingestuft. Je nach Änderung des Kariesstatus wurden die Probanden nach zwei Jahren erneut einer dieser Gruppen zugeordnet. Die "gesunde" Gruppe enthielt 17 Kinder mit 94 Proben, wobei der dmfs während der gesamten Studie null war. Die „Karies-Onset-Gruppe“ enthielt 21 Kinder, die 120 Proben lieferten. Diese Patienten wechselten von einem gesunden zu einem Karies-aktiven Zustand. Die dritte Gruppe war die „Karies-Progression-Gruppe“. Die 12 Kinder mit 70 Proben begannen mit Karies und entwickelten sich zu einem verschärften Krankheitszustand. Die Hypothese dieser Studie war, dass mikrobielle Indikatoren des Karies-Modells in der Lage sein

würden, ECC genau zu diagnostizieren. Um das Modell zu testen, nutzten die Forscher das Modell, um vorherzusagen, ob ein Proband mit einem dmfs von 0 zu Beginn der Studie eine Karies entwickeln würde. Bei der Anwendung auf 42 Proben in dieser Gruppe (21 Proben in Plaque und 21 in Speichel) wurden 17 (81%) der Plaqueproben und 11 (52%) der Speichelpuben korrekt als Karies vorhergesagt. Somit stellen Plaqueproben eine höhere Aussagekraft für die Vorhersage einer beginnenden ECC dar, als es bei Speichelpuben der Fall ist. Für die „Karies-Onset-Gruppe“ berichteten die Autoren, dass die Bakterienvielfalt wichtiger für den Beginn einer ECC war als das Alter der Probanden. Der Altersfaktor sollte somit bei zukünftigen Arbeiten hinsichtlich der ECC-Entwicklung verstärkt berücksichtigt werden. Ferner beschreiben Teng et al., dass die bakterielle Vielfalt als Gesamtes für die Verfolgung des ECC-Beginns bei Kindern in diesem Alter genutzt werden kann. So waren die Gattungen *Streptococcus*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Capnocytophaga*, *Prevotella*, und *Porphyromonas* waren vor allem bei gesunden Kindern zu finden. Die drei Arten *Veillonella atypical*, *V. dispar*, und *V. parvula* konnten als wichtige Mikroorganismen für die Entstehung von ECC identifiziert werden. Auch Arten der Gattung *Prevotella* waren wichtig um eine spätere Erkrankung an ECC vorherzusagen (Teng et al., 2015).

1.3 Untersuchung mikrobieller Lebensgemeinschaften

Die Molekularbiologie und speziell die Erforschung mikrobieller Lebensgemeinschaften hat in den letzten Jahren eine rasche Entwicklung erfahren. Während die kulturellen Verfahren inzwischen kaum noch Anwendung finden, gibt es eine Vielzahl an molekularbiologischen Nachweisverfahren. Neben der klassischen Nachweis-PCR und der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) gibt es noch diverse 16S rDNA Fingerprint-Methoden und vor allem das Next Generation Sequencing (NGS). Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Methoden vorgestellt.

1.3.1 Kulturbasierte Verfahren

Klassische kulturbasierte Verfahren werden noch immer besonders in der klinischen Diagnostik für die Identifizierung von Pathogenen verwendet. So können mit Hilfe einfacher und günstiger Verfahren schnellwachsende Bakterien identifiziert werden. Anschließend können die Mikroorganismen beispielsweise auf Antibiotikaresistenzen getestet werden und weitere biochemische Untersuchungen durchgeführt werden (Fadini und Avogaro, 2010).

Allerdings ist nur eine geringe Anzahl an Arten kultivierbar (Wade, 2002). Daher kann bei Mikrobiomstudien die Artenvielfalt mit Hilfe von kulturbasierten Verfahren nicht erfasst werden. Somit beschränkt sich die Anwendung dieses klassischen Verfahrens auf die oben genannten Analysen: Pathogenitätsnachweis und

Antibiotikaresistenzermittlung. Eine wichtige Rolle spielen moderne Methoden der Kultivierung, um die durch molekularbiologisch als dominant erkannten Mikroorganismen im Labor studieren zu können.

1.3.2 Molekularbiologische Verfahren und Next Generation Sequencing

Mit Hilfe von molekulargenetischen Verfahren kann mit dem Einsatz spezieller Primer für zuvor ausgewählte Gensequenzen (16S rDNA oder spezifische Gene) bei der PCR oder mit Hybridisierungssonden (FISH) ein gezielter Nachweis von Mikroorganismen durchgeführt werden. Aktuell stellt das NGS die modernste Methode dar, um Mikroorganismen und auch ihre Genprodukte zu identifizieren. Der Vorteil dieser Technik ist, dass eine Vielzahl der vorhandenen Mikroorganismen mit entsprechenden Häufigkeiten in denen diese vorkommen, detektiert werden können. Viele Studien nutzen die bakterielle 16S ribosomale DNA (Woo et al., 2008). Der Vorteil dieser Gensequenz liegt vor allen darin, dass ein jedes Bakterium mindestens ein Gen hiervon im Chromosom vorliegen hat. Die 16S rDNA hat neun variable Regionen, die von hochkonservierten Regionen voneinander getrennt werden. Die konservierten Regionen dienen als Bindestellen für die Primer bei molekularbiologischen Verfahren, die die 16S rRNA nutzen. Die variablen Regionen können von Art zu Art spezifisch sein, teilweise kann lediglich bis auf die Gattungsebene differenziert werden (Chakravorty et al., 2007).

1.3.2.1 PCR-basierte Nachweisverfahren

Ein wichtiger Nachweis für den Nachweis von Bakterien und auch Viren ist die PCR (Petti, 2007). Durch die exponentielle Vervielfältigung eines ausgewählten Gens kann dieses identifiziert werden. Abhängig von der Primerwahl kann auch eine bakterielle Gemeinschaft untersucht werden. Die PCR dient hierbei jedoch nur dem Zweck der Vervielfältigung eines Gens. Wie bereits beschrieben, sind diese Primer Universalprimer der konservierten 16S rDNA. Im Folgenden werden weitere biotechnologische Methoden genutzt, um die unterschiedlichen Sequenzen näher zu charakterisieren. Diese werden im Folgenden beschrieben. Generell weist die PCR eine sehr hohe Sensitivität auf und benötigt nur eine geringe Menge an Ausgangs-DNA (>0,5ng oder im Idealfall ein Template-Molekül der entsprechenden DNA).

Limitationen der PCR sind, dass durch die Auswahl der Primer eine Auswahl der nachweisbaren Bakterienarten getroffen wird. Daher kann mit der PCR eine bakterielle Gemeinschaft lediglich auf eine begrenzte Anzahl an Arten untersucht werden. So sind auch die 16S rDNA Universalprimer nicht zwangsweise für alle Arten abdeckend. Hinzu kommt bei der 16S rDNA die ausgewählte Region (Chakravorty et al., 2007, Szafranski et al., 2014). Zusätzlich kann ein fehlerhaftes Verhältnis der Arten entstehen, wenn die Anzahl der Zyklen falsch gewählt wird (Becker et al., 2000). Auch inkorrekte

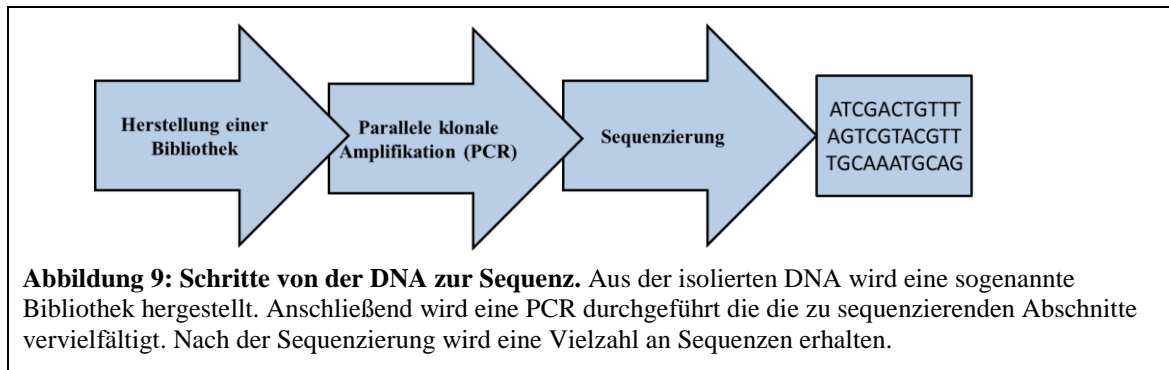
Primeranlagerungen sind möglich, können aber durch ein entsprechendes Primerdesign minimiert werden. Allerdings ist durch eine Anpassung der Primer eine Abnahme der Spezifität möglich. Die Länge der ausgewählten Primer, der GC-Gehalt und die Annealing-Temperatur sind weitere Faktoren, die verändert werden können, um Primer anzupassen.

1.3.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

In zahlreichen Studien wird mittels FISH die Identifizierung von den Bakterienarten vorgenommen (Bayani und Squire, 2004). Charakteristisch für diese Methode sind die fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden, die an bestimmte zuvor festgelegte DNA-Abschnitte oder an die ribosomale RNA binden sollen, wodurch eine Amplifikation des Signals erreicht wird (Bayani und Squire, 2004). Diese Methode ermöglicht es, in hochkomplexen Strukturen, wie etwa Biofilmen, einzelne Zellen eines bestimmten Taxons zu identifizieren und festzustellen, wo diese räumlich vorkommen. Räumliche Interaktionen können somit mit FISH beobachtet werden (Blasco et al., 2003). Selbst unkultivierte Bakterienspezies können mit dieser Methode nachgewiesen werden.

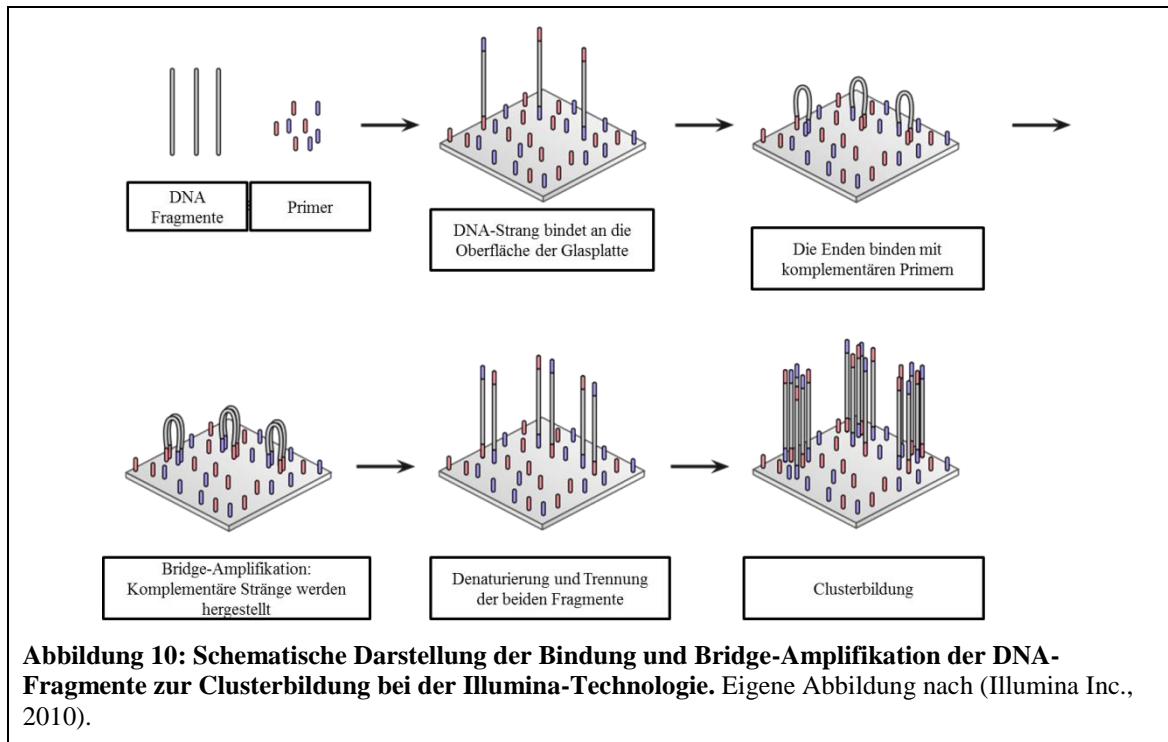
1.3.2.3 Next Generation Sequencing (NGS)

Das Sequenzieren von DNA bedeutet, die Reihenfolge der Basen „sichtbar“ zu machen. Dies geschieht bei der klassischen Sanger-Sequenzierung mit Hilfe von markierten Didesoxynukleotiden, die beim Einbau ein Farbsignal abgeben. Jede der vier Nukleotide hat hierbei eine andere Farbe, sodass durch den Farbencode auf die Sequenz geschlossen werden kann. Der Fortschritt gegenüber der klassischen Sanger-Sequenzierung ist die Zeitersparnis, sowie das kostengünstigere Sequenzieren verbunden mit einer großen Anzahl an Proben zur gleichen Zeit. Zudem kann eine weitaus höhere Auflösung der mikrobiellen Gemeinschaft erreicht werden. So sind bei der Sanger-Sequenzierung bis zu 1000 Klone pro DNA üblich. Demgegenüber stehen eine Vielzahl an reads (normalerweise zwischen 10.000-30.000 pro Probe), die zu ebendieser hohen Auflösung der mikrobiellen Gemeinschaft führen. Als klaren Nachteil angesehen werden kann jedoch die kurze Fragmentlänge, die häufig zwischen 200 und 500 Basenpaaren liegt. Mit der NGS-Technologie ist es möglich, mikrobielle Lebensgemeinschaften hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zu untersuchen. Von der Probe bis zur Sequenz sind es im Allgemeinen – unabhängig vom Hersteller – drei Abschnitte: (1) Herstellung einer Bibliothek, (2) parallele klonale Amplifikation der DNA, (3) Sequenzierung (Abbildung 9).



(1) Die Herstellung einer Bibliothek erfolgt mit der extrahierten DNA der Probe als Grundlage. Je nach Design der Studie erfolgt (a) die direkte Ligation der Adapter an beide Enden der DNA oder (b) vor der Adapterligation eine PCR zur Vervielfachung der Zielregion.

(2) Die grundlegende Methode zur klonalen Amplifikation ist bei der Sequenziertechnologie mit Illumina die sogenannte Festphasen-Amplifikation, oder auch Bridge-Amplifikation genannt (Moorthie et al., 2011). Die Bridge-PCR erfolgt auf einer Glasplatte, auch Flow Cell genannt. Die DNA Fragmente werden über die Adapter an die Platte gebunden. Dies gelingt durch die kovalent bindenden Vorwärts- und Rückwärts-Primer, die auf der Glasplatte immobilisiert sind. Pro DNA-Fragment entstehen nun durch die Amplifikation einzelne getrennte Cluster klonaler Fragmente (Abbildung 10). Je nach Gerät und Chemie (Nukleotide, Polymerase, etc.) sind zwischen 150 und 600 Sequenzierzyklen möglich. Illumina MiSeq-Geräte sind in der Lage zwischen 15 Mio. und 20 Mio. reads zu produzieren. Je nach benötigter Sequenziertiefe sollte hier die entsprechende Anzahl an Proben pro Sequenzierdurchgang ausgewählt werden.



Während Roche die Pyrosequenzierung zu ihrem Standard bei den Geräten gemacht hat, pflegt Illumina die ‚Sequencing-by-Synthesis‘-Methode durchzuführen. Alle vier Nukleotide sind mit einem unterschiedlichen Fluorophor gekoppelt und am 3'-Ende durch eine Azidomethylgruppe modifiziert. Diese Gruppe dient als Terminatorgruppe zur Unterscheidung der eingebauten Base. Die jeweils eingebaute Base spaltet einen Farbstoff ab, der mittels ‚Total Internal Reflection Fluorescence Imaging‘ (TRIF) detektiert wird. Anschließend beginnt ein neuer Syntheszyklus (Bentley et al., 2008). Durch die reversible Terminationsmethode besteht hier nicht die Gefahr von Basendeletionen oder Insertionen. Lange Homopolymere stellen auch kein Problem dar. Es besteht jedoch die Gefahr der Substitution einzelner Basen, vor allem nach dem Einbau von Guanin (Dohm et al., 2008).

1.3.2.4 Herstellung von 16S rRNA Amplikons

Die unter 1.3.2.3 beschriebene Technik kann auch für die Sequenzierung von Amplikons genutzt werden. Amplikons sind durch PCR hergestellte Amplifikationsprodukte. Hierfür benötigt wird isolierte DNA. Für diese Arbeit wurden insgesamt drei PCR Schritte durchgeführt, die unter 2.5.1 näher beschrieben sind. Das Protokoll wurde von Camarinha-Silva *et al.* (Camarinha-Silva et al., 2014) übernommen. Die genutzten Primer sind im Abschnitt 2.1.5 beschrieben.

Zunächst wurde die Zielregion der 16S rDNA amplifiziert. Abbildung 11 zeigt schematisch die entsprechende Region und das Vorgehen bei der Herstellung der Amplikons. Als Forwardprimer wurde bei Basenpaar bp 27 begonnen und bis zum Reversprimer bei bp 338 die Region eingegrenzt. Im nächsten PCR Schritt wurden

Barcodes an die 3'-Region angefügt, wohingegen die 5'-Region mit einem Adapter als Platzhalter verlängert wurde. Insgesamt konnten bis zu 60 Barcodes amplifiziert werden. Ziel der Barcodes ist es, die Anzahl an Proben zu erhöhen, die eindeutig voneinander unterschieden werden können und somit simultan in einem Sequenzierdurchgang verarbeitet werden können. Im dritten Schritt wurden an das 5'-Ende Illumina-Sequenzieradapter amplifiziert und an das 3'-Ende ein Multiplexing Adapter. Illumina stellt bis zu zwölf unterschiedliche Sequenzieradapter zur Verfügung. Diese haben den Zweck, dass die hergestellten Amplikons an die für den Sequenzierdurchgang notwendigen Glasplatten mit entsprechend komplementären Sequenzen binden und die Proben auseinandergehalten werden können. Nach der dritten PCR wurden alle hergestellten Amplikons auf die gleiche Konzentration eingestellt, damit diese miteinander verglichen werden konnten. Die gewählte Konzentration betrug 10 ng DNA pro Probe. Die Länge der Amplikons betrug insgesamt etwa 520 bp. Anschließend wurden die Amplikons sequenziert.

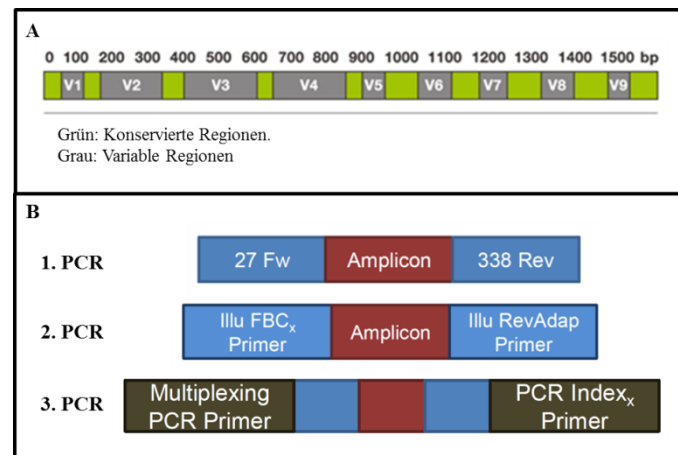


Abbildung 11: Herstellung der 16S rDNA-Amplikons. A zeigt schematisch das gesamte 16S rDNA Gen mit den variablen und konservierten Regionen. In B ist die Erstellung von 16S rDNA-Amplikons für die Illumina-Sequenzierung schematisch gezeigt.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziele dieser Arbeit sind (1) eine Analyse der räumlichen Autokorrelation von Milchzahnkaries in den Kindergärten in Braunschweig anhand von Daten des Gesundheitsamtes der Stadt Braunschweig, sowie eine zeitliche Verlaufsanalyse dieser Daten von 2009-2014, (2-5) die Auswertung epidemiologischer Daten und die Analyse des Mikrobioms kariöser und nicht-kariöser Milchzähne von Kindern aus drei verschiedenen Studien und (6) eine vergleichende Analyse der Mikrobiomzusammensetzung vor und nach dem Zähneputzen. Für die Mikrobiomanalyse wurde die DNA von zuvor entnommenen Zahnabstrichen isoliert und mit NGS sequenziert. Die erhaltenen Sequenzierdaten dienten als Grundlage für alle weiteren Analysen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.

| | |
|-------------------------------------|-------------|
| 6 x Loading Dye Solution | Fermentas |
| 6 x MassRuler™ Loading Dye Solution | Fermentas |
| 50 x TAE | |
| Agarose NEEO Ultra | Roth |
| Ethanol (Absolut) | J. T. Baker |
| Ethidiumbromid | Unbekannt |
| Nuclease-free water | Qiagen |
| RNAlater | Qiagen |

2.1.2 Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme.

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| PrimeSTAR HS DNA Polymerase | Clontech TaKaRa |
|-----------------------------|-----------------|

2.1.3 Verwendete Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits.

| | |
|-----------------------------|----------------|
| FastDNA™ SPIN Kit for Soil | MP Biomedicals |
| Qiaquick Gel Extraction Kit | Qiagen |
| PCR purification kit | Qiagen |

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

| Gerät | Typ | Hersteller |
|----------|---------------------------------|------------|
| Autoklav | Dampfsterilisierer 4-4-9 S1 | Sauter |
| Autoklav | Dampfsterilisierer 9-6-9 HS1 FD | Sauter |

| | | |
|-------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Autoklav | Dampfsterilisierer KSG 112 | KSG |
| Block thermostat | SHT 1D | STUART SCIENTIFIC |
| Cleanbench | HERA-Safe HS 18 | Heraeus |
| Cleanbench | LaminAir HLB 2472 | Heraeus |
| Gelelektrophoresekammer | HORIZON 11 14 | Life Technologies |
| Gelelektrophoresekammer | HORIZON 58 | Life Technologies |
| Luminescence reader | Wallac Victor3 142 Multilabel counter | Perkin-Elmer Life Sciences |
| Mikrowelle | ProII 1400 (NE 1440) | Panasonic |
| Pipetten | Unterschiedliche Größen | Eppendorf |
| Schüttler | Plattformschüttler 2100 | INNOVA |
| Schüttler | Swip KM-2 | Edmund Bühler |
| Thermocycler | ProfessionalTRIO | Biometra |
| Zentrifuge | 5417C | Eppendorf |

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide.

| Primername | Sequenz | Verwendung |
|--|---|----------------|
| 27F | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG | 1 Amplikon-PCR |
| 338R | TGCTGCCTCCCGTAGGAGT | 1 Amplikon-PCR |
| Barcode (Beispiel) | ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTAA TGCCAAGAGTTTGATCMTGGCTCAG | 2 Amplikon-PCR |
| Reverse Adapter | GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTT GCTGCCTCCCGTAGGAGT | 2 Amplikon-PCR |
| Illumina Index (Beispiel 1 von 12 möglichen) | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTC CCTACACGACGCTCTTCCGATCT | 3 Amplikon-PCR |
| Multiplexing | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTGATGTGA CTGGAGTTC | 3 Amplikon-PCR |

2.2 Statistische Analyse der Milchzahnkaries bei Kindern in Braunschweig

Die statistische Analyse wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe für Epidemiologische und Statistische Methoden (Leiter Prof. Dr. Rafael Mikolajczyk) durchgeführt.

2.2.1 Datensätze

Insgesamt wurden zwei Datensätze für die Auswertung genutzt. Beide Datensätze wurden von der Stadt Braunschweig zur Verfügung gestellt. Während der Datensatz der jugendzahnmedizinischen Untersuchung von Herrn Rainer Schubert (Gesundheitsamt Braunschweig, Gesundheitsstrategie) aufbereitet und zur Verfügung gestellt wurde, liegt der Datensatz der soziodemographischen Daten zur freien Verfügung bereit und wurde von dem Sozialreferat der Stadt Braunschweig aufgearbeitet und als Sozialatlas im Jahr 2013 veröffentlicht.

Die Zahndaten lagen als longitudinale Daten von den Jahren 2009 bis 2014 vor. Die gesammelten Variablen waren pro Kindergarten und Kindertagesstätte neben der Anzahl der untersuchten Kinder der dmft-Index pro Kindertagesstätte. Die dmft-Daten wurden gewichtet nach Anzahl der untersuchten Kinder pro Stadtteil. Anschließend wurden die Kindergärten mit Hilfe einer Stadtkarte und den entsprechenden Adressen den einzelnen Stadtteilen zugeordnet, sodass ein durchschnittlicher dmft-Index pro Stadtteil berechnet werden konnte. Die Sozialdaten lagen aus dem Jahre 2012 vor und umfassten neben dem Anteil der arbeitslosen Personen pro Stadtteil und dem Anteil der Personen mit Migrationshintergrund noch weitere Variablen, etwa zur Anzahl an Personen pro Stadtteil, Kinder Pro Stadtteil und weitere, die aber nicht in der Analyse verwendet wurden.

2.2.2 Programme für die Datenauswertung

Die Daten lagen in Form von Excel-Tabellen (Microsoft Corporation) vor. Die Datenauswertung wurde sowohl mit dem Open-Source Statistikprogramm R (Version 3.3.1) als auch dem Statistikprogramm STATA 12 durchgeführt. Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Pakete aufgezählt.

2.2.2.1 R-Pakete

Neben den Standardpaketen wurden zusätzlich noch die Pakete `sp`, `rgdal`, `maptools`, `ggplot`, `RColorBrewer`, und `ClassInt` zur Visualisierung der Daten verwendet. Für das

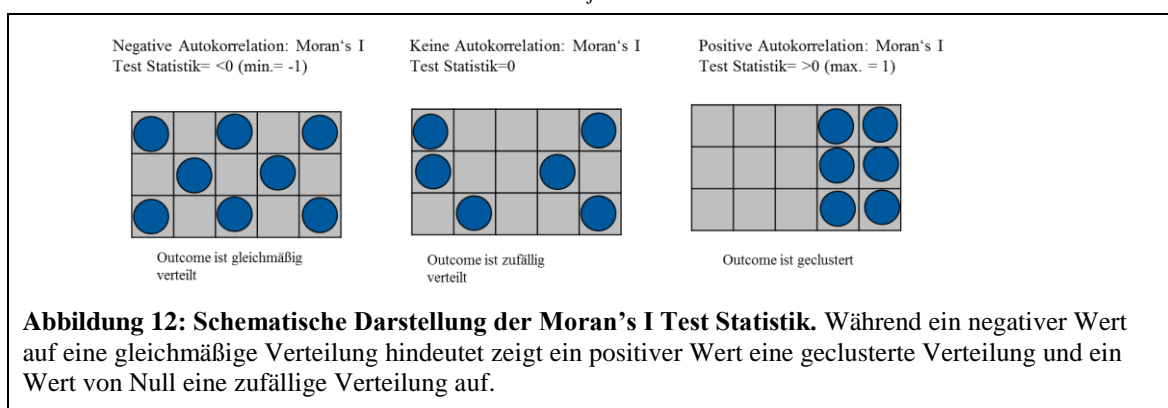
Datenmanagement und die Berechnungen wurden die Pakete *acs*, *truncreg*, *MASS*, *stats*, *DescTools*, und *spdep* genutzt.

2.2.2.2 STATA-Pakete

Neben den Standardbefehlen für das Datenanalyseprogramm wurde noch zusätzlich das Paket *traj* (Jones et al., 2001) genutzt, um Trajectories (Verläufe) der longitudinalen Zahndaten auftrennen zu können.

2.2.3 Moran's I

Der Moran's I ist in der räumlichen Statistik ein probates statistisches Mittel, um die räumliche Clusterung von Daten zu identifizieren (Moran, 1950). Die hier betrachtete Variable war der dmft-Index der untersuchten Kinder auf Stadtteilebene. Bei dem Moran's I werden alle Daten einer ausgewählten Karte betrachtet und anschließend ein Wert zwischen -1 und +1 ausgegeben. Während -1 eine gleichmäßige Verteilung der Daten bedeutet, zeigt ein Wert von 0 eine zufällige Verteilung und eine +1 eine Clusterung der Daten (Abbildung 12). Für die Beziehung der Daten untereinander gibt es verschiedene Kriterien, die vor der Berechnung ausgewählt werden müssen. In diesem Falle wurde die Queens contiguity rule ausgewählt. Diese Regel besagt, dass alle Ecken und Kanten für eine Nachbarschaft berücksichtigt werden. Im Gegensatz hierzu steht etwa die Rooks contiguity rule, bei der lediglich alle Kanten berücksichtigt werden. Abbildung 10 stellt die unterschiedlichen Methoden der Moran's I-Berechnung schematisch dar. Notwendig für eine Nachbarschaftsberechnung ist zudem eine Nachbarschaftsmatrix. Die Anzahl der Stadtteile (n) wurde in folgender Form für die Matrix (W) berechnet: $n \times n$. Dies bedeutet, wenn $w_{ij}=1$, sind die Stadtteile i und j direkte Nachbarn und ansonsten bedeutet $w_{ij}=0$ (Anselin, 2002).



2.2.4 Lineare Analyse und Trajectories

Zunächst wurde mit dem STATA-Befehl *mfp* eine teilweise polynomielle Regression (fractional polynomial analysis) (Royston et al., 1999) durchgeführt, die eine lineare

Regression als adäquate Analysemethode aufzeigte. Mit der linearen Regression wurde der Trendverlauf der dmft-Werte von 2009 bis 2014 analysiert. Eine weitere Betrachtung der Trends ist die Trajectory-Analyse, oder auch Verlaufsanalyse. Mit dieser Analyse wird nicht nur der gesamte Verlauf betrachtet, sondern auch auf Heterogenität innerhalb der Daten über die Zeit geprüft. Ein notwendiges Kriterium hierfür ist das Bayesian Information Criterion (BIC) (Lukočienė und Vermunt, 2010, Jones et al., 2001). Die Anzahl der Trajectories (Komplexität des Modells) wurde bei dieser Analyse so lange erhöht, bis der BIC nicht weiter abnimmt.

2.2.5 Spatial lag Modell

Das spatial lag Modell bezieht sowohl die räumliche Komponente des Moran's I mit ein, als auch eine lineare Regression der Daten. Für dieses Modell wurden neben den durchschnittlichen dmft-Werten pro Stadtteil des Jahres 2014, dem Anteil der Arbeitslosen Personen zwischen 16 und 65 Jahren, auch noch der Anteil der Personen mit Migrationshintergrund ausgewählt. Berechnet wird dieses Modell mit folgender Formel:

$$y = \rho Wy + X\beta + \varepsilon.$$

y ist hierbei ein Vektor der betrachteten Variablen (durchschnittlicher dmft-Index der Stadtteile). W ist hierbei dieselbe Nachbarschaftsmatrix, die bereits unter 2.6.3 eingeführt wurde. X ist die Matrix der erklärenden Variablen (hier: Anteil der arbeitslosen Personen und Anteil der Personen mit Migrationshintergrund), ε ist ein Vektor der unabhängigen und identisch verteilten Fehler des Modells. ρ and β sind Parameter, die für die Effektgröße (β) des Modells, beziehungsweise für den spatial lag Koeffizienten (ρ) stehen. Ein beta (β) von Null zeigt keine Verbindung von dem Outcome (dmft-Index) und der erklärenden Variablen an. Demgegenüber bedeutet ein beta von 1 eine eins zu eins Beziehung beider an. Rho (ρ) ist der spatial lag Koeffizient. Dieser ist angelehnt an den Moran's I. Ein Wert von -1 bedeutet eine gleichmäßige Verteilung, ein Wert von 0 eine zufällige und ein Wert von +1 eine geclusterte Verteilung des dmft Index. Der spatial lag-Term des Modells (ρWy) zielt darauf ab, alle nicht beobachteten, aber räumlich miteinander zusammenhängenden Variablen an das Modell anzupassen.

2.2.6 Erstellung der Stadtkarten

1.1.1 Die Stadtkarten wurden mit dem open source Statistikprogramm R, das bereits 2.6.2 eingeführt wurde, erstellt. Neben den oben genannten Paketen, die für die Erstellung und Einfärbung notwendig sind, wurde eine Stadtkarte der Stadt Braunschweig verwendet. Diese Karte lag im Shapefile-Format (.shp) vor und wurde

von dem Geoinformationsdienst der Stadt Braunschweig zur Verfügung gestellt. Shapefile Daten speichern nicht-topographische Geometriedaten und –eigenschaften für die räumliche Anwendung von einem Datensatz. In diesem Fall war das die Stadtstruktur von Braunschweig mit ihren Stadtteilen und Stadtteilgrenzen. Shapefile Daten bestehen aus drei unterschiedlichen Informationsstrukturen: Einem Hauptdatensatz, einem Indexdatensatz und einer dBASE Tabelle. Der Hauptdatensatz enthält eine Liste der Vektoren mit ihren Längen und Form. Der Index Datensatz kompensiert die Daten des Hauptdatensatzes. Die dBASE Tabelle stellt die geographischen Daten in einem weiteren Format dar, das ebenfalls zur Unterstützung des Hauptdatensatzes dient.

2.3 Studienplanung und Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Studien geplant und durchgeführt, sowie zwei weitere Projekte zur Probengewinnung organisiert. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Studien und Projekte kurz vorgestellt.

2.3.1 KraKi-Studie

Unter dem Akronym KraKi (Infektionskrankheiten bei Kindern erkennen und verhindern) wurde eine viermonatige prospektive Kohortenstudie zur Vorbeugung von Infektionskrankheiten bei Kindern in Braunschweig von November 2014 bis März 2015 in Kooperation mit Kristin Maria Schlinkmann und Prof. Dr. Rafael Mikolajczyk aus der Arbeitsgruppe „Epidemiologische und Statistische Methoden“ vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung geplant und durchgeführt. Diese Studie gliederte sich in verschiedene Module. Hauptziel der Studie war die Erfassung von Präventionsmaßnahmen in Haushalten und Kindertagesstätten sowie die Erfassung der Häufigkeiten von Gastrointestinalen Infektionen (acute gastrointestinal infections, AGI) und Infektionen der oberen Atemwege (acute respiratory infections, ARI). Ein Modul hat zusätzlich die Übertragung von Infektionen in Familien erfasst und ein weiteres Modul zielte auf die Erfassung der Karieserkrankung unter den Studienteilnehmern ab. Zudem wurde bei diesem Modul (Zahnmodul) von den teilnehmenden Kindern ein Zahnabstrich entnommen, um die mikrobielle Zusammensetzung der Zahnplaque zu untersuchen.

Von der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) wurde der Ethikantrag (Nr. 2380-2014) begutachtet und in der Form angenommen, wie eingereicht (siehe Anhang 1/Studienprotokoll und Ethikvotum). Bei der Bundesbehörde für Datenschutz in Berlin wurde das Datenschutzkonzept eingereicht und ebenfalls angenommen (siehe Anhang 1/Datenschutzkonzept). Nach telefonischer Kontaktaufnahme mit den

Kindergartenträgern aller 151 Kindertageseinrichtungen in Braunschweig wurden die Einrichtungen kontaktiert. Anschließend wurden die Teilnehmenden in den teilnehmenden Kindergärten rekrutiert. Die Rekrutierung fand teilweise vor Ort und mit persönlichen Gesprächen bei Elternabenden und zu den Hol- und Bringzeiten der Kinder statt, teilweise durch die Auslage von Flyern (siehe Anhang 1/Flyer). Mit einer Rückpostkarte konnte das Interesse an der Studie bekundet werden. An alle Studieninteressierten wurden die entsprechenden Studienmaterialien versandt. Zu den Studienmaterialien zählten neben der Einverständniserklärung, einem Informationsblatt und der Entscheidung für die einzelnen Module, zwei Fragebögen. Ein Fragebogen erfasste demographische und sozioökonomische Daten (siehe Anhang 1/Fragebogen Baseline), sowie Fragen zu Prävention und Übertragungsvermeidung von Infektionskrankheiten im Haushalt. Der zweite Fragebogen befasste sich mit der Mund- und Zahnhygiene, sowie mit der Ernährung der Kinder (siehe Anhang 1/Fragebogen Zahnmodul).

Im Rahmen dieser Studie konnten die Eltern angeben, ob von ihren Kindern im Rahmen der jährlichen zahnmedizinischen Untersuchung des Gesundheitsamtes Braunschweig/Jugendzahnmedizinischer Dienst (Leitung Henny Sudradjat) ein Zahnabstrich entnommen werden durfte. Einschlusskriterien waren ein Alter der Kinder zwischen drei und sechs Jahren zum Zeitpunkt der Entnahme, sowie mindestens zwei vorhandene Schneidezähne des Oberkiefers. Die Entnahme erfolgte mit sterilen Abstrichstäbchen (FloqSwabs, Copan). Nach der Entnahme wurden die Abstriche unverzüglich in *RNAlater* bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von maximal fünf Tagen an das Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung transportiert und bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung konserviert. Tabelle 6 führt die Befunde der jährlichen Untersuchung auf, die im Befundbericht vermerkt wurden.

Tabelle 6: Erfasste Erkrankungen und Eintragungen im Befundbericht bei der jährlichen zahnmedizinischen Untersuchung des Gesundheitsamtes. Da es sich bei den untersuchten Zähnen um Milchzähne handelt sind die Abkürzungen repräsentiert durch Kleinbuchstaben.

| Befund | Abkürzung im Befundbericht |
|---------------------------|----------------------------|
| Gesund | s |
| Füllung | f |
| Versiegelt | v |
| Hypoplasie | h |
| Initialkaries | i |
| Karies (decayed) | d |
| Dentinkaries | k |
| Zerstört | z |
| Wurzelrest | w |
| Extrahiert (wegen Karies) | e |
| Nicht durchgebrochen | u |
| Nicht beurteilbar | x |
| Fistel | f |

2.3.2 Zahnmikrobiom indonesischer Kinder

Die Probenentnahme in Indonesien fand im August 2015 statt. Hierfür verantwortlich zeigte sich die Leiterin des Jugendzahnmedizinischen Dienstes des Gesundheitsamtes in Braunschweig, Henny Sudradjat. Im Rahmen einer jährlichen Untersuchung in der Region Cirebon/West-Java in einer Einrichtung für alleinerziehende Mütter wurden nach vorheriger Aufklärung der Mütter Zahnabstriche mit sterilen Abstrichstäbchen (FloqSwabs, Copan) entnommen und anschließend in *RNAlater* im Kühlschrank gelagert. Die Zustimmung der regionalen Behörden lag hierfür vor. Die Entnahme fand an zwei aufeinanderfolgenden Tagen statt und wurde identisch zu der „KraKi“-Studie (siehe 2.3.1) durchgeführt. Die Proben wurden unverzüglich per Kurierdienst nach Braunschweig transportiert. Nach fünf Tagen Transport wurden sie bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung konserviert. Die Befunddokumentation erfolgte ähnlich der aus 2.3.1 (Tabelle 6).

2.3.3 Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies

In Kooperation mit dem Oberarzt PD Dr. Jan Kühnisch von der Ludwig Maximilians Universität München (LMU), Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie wurde diese Studie geplant und durchgeführt. Der Ethikantrag (siehe Anhang 2) wurde von der Ethikkommission der LMU geprüft und ein positives Ethikvotum wurde ausgestellt.

Die Probenentnahme wurde nach Aufklärung der Eltern von den Kindern in der LMU durchgeführt. Der Studienzeitraum erstreckte sich von Januar 2015 bis März 2016. Insgesamt wurden 30 Probanden mit ECC und 10 gesunde Probanden als Kontrollgruppe rekrutiert. Die Einstufung der Karies wurde nach (Wyne, 1999) in die drei verschiedener Typen vorgenommen. Typ I beschreibt eine milde und initiale Form der ECC mit Befall der oberen Frontschneidezähne, Typ II beschreibt bereits eine fortgeschrittene Form mit Befall der unteren Zähne und Backenzähne und bei Typ III sind bereits alle Zähne des Gebiss befallen und kariös. Die Auswahlkriterien waren eine Erstvorstellung in der Klinik und eine beginnende, beziehungsweise bereits fortgeschrittene frühkindliche Karies (mindestens Typ I). Das Alter der Kinder betrug 3 bis 6 Jahre. Nach der Probenentnahme mit sterilen Abstrichstäbchen (FloqSwabs, Copan) wurden die Proben in *RNAlater* konserviert und zunächst bei -80 °C in München, bis zu dem Weitertransport nach Braunschweig, gelagert. Für den Transport nach Braunschweig wurden die Proben mit Trockeneis gekühlt und in Braunschweig anschließend ebenfalls bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.3.4 Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen

Die Proben für dieses Projekt wurden von zwei freiwilligen gesunden Menschen mittels Selbstbeprobung entnommen. Es wurde bei der Probandenauswahl auf ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis und ein gesundes Gebiss geachtet. Ziel war die Erfassung der Variabilität des oralen Mikrobioms von Tag zu Tag, im Tagesverlauf, und bei zwei verschiedenen Menschen.

Die Probenentnahme mit sterilen Abstrichstäbchen (FloqSwabs, Copan) erfolgte im Februar 2015 und umfasste sieben Tage. Nach der Entnahme wurden die Abstrichstäbchen in *RNAlater* überführt und somit maximal sieben Tage bei Raumtemperatur gelagert. Nach Abschluss der Probenentnahme wurden selbige unverzüglich bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert und konserviert.

2.4 Standardisierung der klinischen Untersuchung und Probenentnahme

Für alle Studien wurden einheitlich FloqSwabs (Copan) für die Probenentnahme verwendet. Die Swabs wurden anschließend in mit 1mL RNAlater™ (Invitrogen™) gefüllte Eppendorfgefäße konserviert. Die Probenentnahme erfolgte so steril wie möglich und ohne die Proben durch Oberflächen, Haut des Probanden oder des Untersuchers oder der Umwelt zu kontaminieren. Als Kontrolle wurden bei jedem Entnahmetag auch eine Negativkontrolle entnommen, also ein steril verpackter Swab nach dem Entpacken direkt in die Konservierungslösung gebracht. Im Folgenden werden Ähnlichkeiten und Unterschiede der einzelnen Projekte bei der Entnahme dargestellt. Bei allen Studien und Projekten hatten die Teilnehmer jederzeit die Möglichkeit aus der Studie/dem Projekt auszusteigen und um die Löschung der Probandendaten zu bitten und somit ihre Teilnahme zu beenden. Die mikrobiologischen Proben wurden nicht vernichtet, jedoch in der Analyse nicht berücksichtigt.

2.4.1 KraKi-Studie

Die Entnahme der Zahnproben erfolgte bei der jährlichen Untersuchung des jugendzahnärztlichen Dienstes des Gesundheitsamtes Braunschweig in den einzelnen Kindertagesstätten. Diese Untersuchung wurde von vier unterschiedlichen Zahnärzten durchgeführt. Zu Beginn der Studie haben alle Zahnärzte eine Einweisung und eine Anleitung für die Durchführung der Entnahme erhalten. Mit Hilfe einer mobilen Beleuchtungseinrichtung wurden entsprechend ausreichende Lichtverhältnisse sichergestellt. Die beprobten Zähne waren die vestibulären (Außenseite) Frontschneidezähne (Incisivi) des Oberkiefers. Die Oberlippe wurde von den Zähnen ferngehalten und der Swab mehrere Male auf der Zahnoberfläche hin und her gestrichen. In Abbildung 12a ist eine Übersicht der beprobten Zähne zu sehen.

2.4.2 Zahnmikrobiom indonesischer Kinder

Bei diesem Projekt war die Probenentnahme ähnlich der KraKi-Studie. Die Proben wurden alle von der Leiterin des jugendzahnärztlichen Dienstes des Gesundheitsamtes Braunschweig entnommen. Die Entnahme erfolgte im Rahmen einer jährlichen Kontrolluntersuchung in einer indonesischen Einrichtung für alleinerziehende Mütter und ihre Kinder. Die Einrichtung in Cirebon/West Java (Indonesien) hatte Zahnarztstühle zur Verfügung und konnte für eine entsprechende Beleuchtung sorgen. Die beprobten Zähne waren ebenfalls die vestibulären Oberkieferschneidezähne.

2.4.3 Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies

Die Proben wurden während der zweiten Vorstellung der Kinder in der LMU von OA PD Dr. Jan Kühnisch entnommen. Die Kinder mussten sich wegen der fortgeschrittenen Karies einer weitreichenden Zahnrestauration unterziehen. Im Rahmen dieser Maßnahme wurden die Probanden narkotisiert (Vollnarkose) und zunächst die Zähne beprobt. Vor der Beprobung wurden die Zähne trockengepustet, sodass eine Speichelkontamination ausgeschlossen werden kann. Die Proben wurden von jeweils vestibulär entnommen. Aus jedem Quadranten wurden die Backenzähne (Molaren), Eckzähne (Canini) und die Schneidezähne (Incisivi) zusammengekommen beprobt, sodass insgesamt zwölf Proben pro Proband zustande kamen. Eine detaillierte Abbildung der beprobten Zähne ist in Abbildung 13B zu sehen. Zusätzlich wurden zehn kariesfreie Probanden als Kontrollgruppe ausgewählt. Hier wurde ein identisches Protokoll (mit Ausnahme der Vollnarkose) angewandt. Von den gesunden Probanden wurde jeder Zahn einzeln innen wie außen abgestrichen. Für die Analyse wurden jedoch ausschließlich die vier Proben der Oberkieferfrontschneidezähne genutzt (siehe Abbildung 13A gezeigt). Diese wurden hierfür zusammengekommen und anschließend weiterverarbeitet.

2.4.4 Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen

Die Probenentnahme erfolgte hier durch Selbstbeprobung. Nach entsprechender Einweisung waren beide Probanden in der Lage bei sich selbst einen Zahnabstrich vorzunehmen. Wie bei 2.4.1 und 2.4.2 beschrieben wurden hier ebenfalls die vestibulären Incisivi des Oberkiefers für die Entnahme ausgewählt. Beide Probanden wurden angewiesen über sieben Tage hinweg je sechs Proben pro Tag zu entnehmen. Die Proben wurden jeweils morgens, mittags und abends vor und nach dem Zähneputzen (beziehungsweise mittags vor und nach einer Mahlzeit) entnommen. Ein Schema der Probenentnahme ist in Abbildung 13C zu sehen.

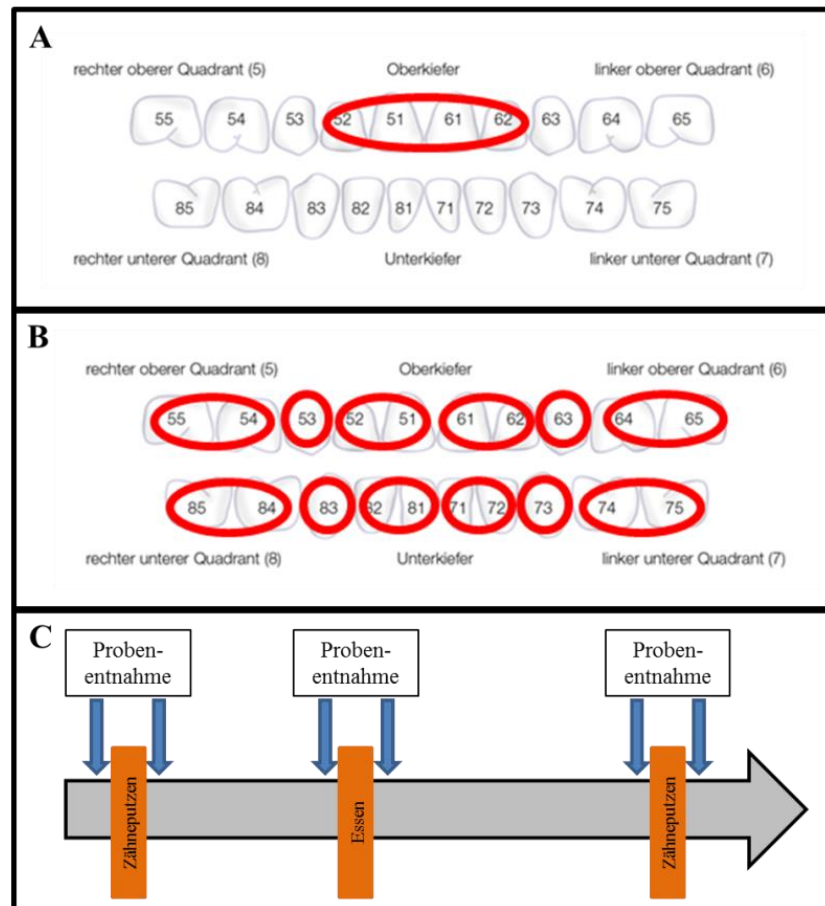


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Lokalisation für die Probenentnahme. Für die KraKi-Studie, die Proben aus Indonesien und die Proben für die Variabilität des oralen Mikrobioms wurden die Zähne in A gezeigt verwendet. Zu beachten ist, dass es sich hier um die schematische Darstellung von Milchzähngebissen handelt. In B ist das Entnahmeprotokoll für die Proben von Kindern mit frühkindlicher Karies aus München zu sehen. In C dargestellt sind die Beprobungszeitpunkte für die Untersuchung der Variabilität des oralen Mikrobioms.

2.5 DNA- Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurde ein mechanisches Zellaufschlussprotokoll gewählt. Hierfür wurde das FastDNATM SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) gewählt das für die mechanische Lyse unterschiedlich große Beads hat. Das Vorgehen wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zusammengefasst dargestellt.

Von der gesamten Probe in RNeasyTM wurden 500 µL für den Zellaufschluss verwendet. Laut Hersteller der Swabs (Copan) gelangen jegliche Zellen, die an der Oberfläche des Swab anheften, in das jeweilige Lösungsmedium. Nach Zugabe von der entsprechenden mitgelieferten Pufferlösung (978 µL Natriumphosphat/122µL MT-Puffer) zu der Probe wurde diese homogenisiert. Die Homogenisation wurde mit einem FastPrep Instrument (Omni Bead Ruptor 24) durchgeführt. Die Probe wurde drei Mal

für 40 Sekunden bei einer Stärke von 6 m/s homogenisiert. Anschließend wurde nach einem Zentrifugationsschritt (10 min./14.000rpm) der Überstand für die DNA-Extraktion weiter verwendet. Abschließend wurde die gesamte auf der Säule befindliche isolierte DNA in 75 µL steriles Wasser eluiert. Die Elution gelang über einen Zentrifugationsschritt (1 min./14.000 rpm). Anschließend wurde die DNA für die weiteren Schritte bei -20 °C gelagert.

2.5.1 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Die Bedingungen für alle PCRs waren für jeden Probensatz identisch. Tabelle 7 zeigt die eingesetzten Volumina der entsprechenden Lösungen und Puffer. Für alle Proben wurde eine PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Clontech TaKaRa) verwendet. Tabelle 8 zeigt das verwendete PCR-Programm.

Tabelle 7: Volumina für die Amplikon-PCR. In Schritt eins wurde als DNA Template die isolierte DNA der Probe genommen, für die weiteren Schritte diente das Produkt der vorherigen PCR als Template.

| Volumen (Angaben in µL) | | | Lösung |
|-------------------------|-----------|-----------|-------------------------|
| 1. PCR | 2. PCR | 3. PCR | |
| 4 | 4 | 10 | Puffer |
| 1,6 | 1,6 | 4 | dNTPs |
| 0,5 | 0,5 | 1,25 | Forward Primer |
| 0,5 | 0,5 | 1,25 | Reverse Primer |
| 0,2 | 0,2 | 0,5 | Polymerase |
| 2,0 | 2,0 | 1,0 | DNA Template |
| 11,2 | 11,2 | 32 | DEPEC Wasser |
| 20 | 20 | 50 | Gesamtes Volumen |

Tabelle 8: PCR Bedingungen für die Amplikon PCR. Die erste PCR wurde mit 20 Zyklen durchgeführt. Die weiteren mit jeweils 15, beziehungsweise 10 Zyklen.

| Temperatur | Zeit | |
|------------|--------|------------------------|
| 95° C | 3 min | |
| 98° C | 10 sec | |
| 55° C | 10 sec | 20/15/10 Zyklen |
| 72° C | 45 sec | |
| 72° C | 2 min | |
| 4° C | Pause | |

2.5.2 Gelelektrophorese und Aufreinigung des PCR- Produktes

Nach dem dritten PCR-Durchgang wurden alle Proben auf ein 2% Agarosegel gegeben und auf die korrekte Größe (~520 bp) überprüft. Da nahezu alle Produkte eine zweite Bande vorwiesen, die bei etwa 200 bp lag, wurde entschieden die Bande mit gewünschter Größe von ~520 bp zu extrahieren und aufzureinigen, damit für die weitere Sequenzierung keine Artefakte oder Readverluste auftreten konnten. Die Größe der zweiten Bande lässt auf Primer-Dimere der zweiten und dritten PCR schließen.

Die Gelaufreinigung wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend der Anleitung durchgeführt. Zusammengefasst bedeutet dieses nach der Extraktion der Bande wurde 1 mL QG-Puffer auf die extrahierte Bande in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Entscheidend hierbei ist, dass die Bande vollständig bedeckt von dem Puffer ist. Das Gelstück wurde bei 15 min. bei 50 °C inkubiert und vollständig aufgelöst. Nach anschließender Zugabe von 300 µL Isopropanol und entsprechendem Durchmischen wurde gemäß Protokoll das gesamte Volumen auf die mitgelieferte Säule gegeben und im abschließenden Schritt mit Hilfe eines Zentrifugationsschrittes (1 min./14.000rpm) mit 50 µL Elutionspuffer eluiert.

2.5.3 DNA-Konzentrationsmessung

Für die Sequenzierung von Proben ist es notwendig, eine Konzentrationsbestimmung durchzuführen. In dem besonderen Fall der Amplikonsequenzierung mit einer großen Anzahl an Proben, die hinterher miteinander verglichen werden sollen, ist zudem darauf zu achten, dass alle Proben die gleiche Konzentration aufweisen. Wie bei Camarinha-Silva *et al.* (Camarinha-Silva et al., 2014) beschrieben, wurden pro Probe 10 ng des Amplikons eingesetzt. Die Ausgangskonzentration wurde mit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) gemessen. Die Messung wurde entsprechend der mitgelieferten Anleitung durchgeführt.

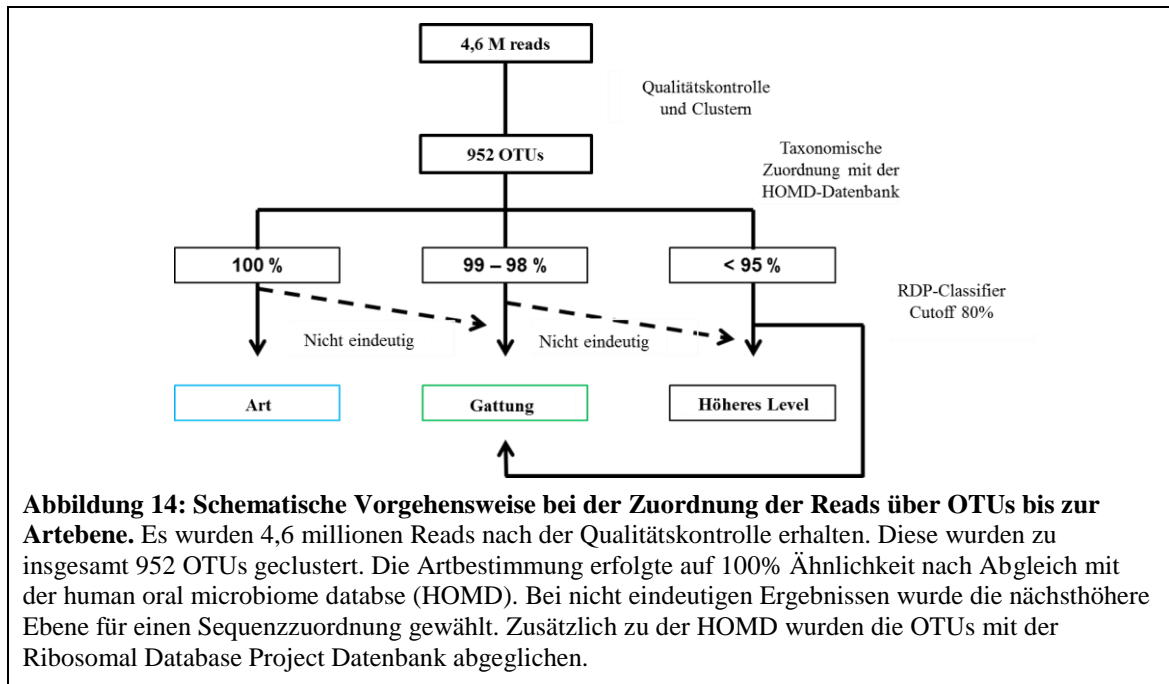
2.5.4 Sequenzierung und Datenauswertung

Die Sequenzierung wurde von der Sequenziereinheit Genomanalytik (GMAK) am HZI in Braunschweig durchgeführt. Hierfür wurde ein MiSeq 500 von Illumina (Illumina) mit 250 bp Paired End Technologie genutzt. Somit konnte die komplette Länge der Amplikonsequenz bei der Sequenzierung abgedeckt werden. Pro Sequenzierdurchgang waren ~14 Mio Reads für alle Proben veranschlagt. Pro Durchgang wurden etwa 250 bis 300 Proben zeitgleich sequenziert, sodass theoretisch 46.000 Reads pro Probe als Ergebnis bereitstehen sollten.

Die erhaltenen Reads wurden anschließend auf ihre Qualität hin überprüft und bioinformatisch zu Operational Taxonomic Units (OTU) zusammengefasst. Das Zusammenfassen, oder auch clustern genannt, der Reads zu OTUs wurde basierend auf dem Protokoll von Camrinha-Silva *et al.* (Camarinha-Silva et al., 2014) durchgeführt. Abweichend von diesem Protokoll wurde anstelle der 99% Ähnlichkeit eine 97% Ähnlichkeit der Readsequenzen ausgewählt. Zudem wurde zum Clustern der OTUs abweichend von Camrinha-Silva *et al.* die software mothur anstelle von der qiime software genutzt. Nach dem Clustern der Sequenzen zu OTUs wurden alle OTUs aussortiert, die in weniger als 0,001% der Proben aller Projekte vorkamen. Weiterhin wurden alle OTUs ausgeschlossen, die nur ein oder zwei Reads pro Probe vorweisen konnten. Anschließend wurde die taxonomische Zuordnung der OTUs vorgenommen (siehe 2.5.5). In die weitere Analyse wurden ausschließlich Proben mit einer Sequenziertiefe von mindestens 4.500 reads pro Probe eingeschlossen. Die Ähnlichkeitsanalyse der Proben wurde mit der Software Primer6 nach Normalisierung der Daten durchgeführt. Normalisierung bedeutet hier, dass nicht die tatsächliche Readzahl pro OTU genutzt wurde, sondern der Anteil hiervon (in %). Für die Erstellung der Grafiken wurde ein metrisches Maß (Euklidische Distanz) ausgewählt.

2.5.5 Taxonomische Zuordnung

Die Taxonomische Zuordnung wurde mit Hilfe zweier Datenbanken vorgenommen. Zunächst wurde die Artbestimmung mit der Onlineversion der Datenbank „Human Oral Microbiome Database“ (HOMD) vorgenommen (<http://www.homd.org/>). Sofern die Artzuordnung eindeutig vorgenommen werden konnte, wurde diese so übernommen. Als Kriterium wurde hier eine 100 %-Übereinstimmung gewählt. Andernfalls wurde die Datenbank Ribosomal Database Project Classifier (RDP-Classifer: <http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) für die OTU-Zuordnung auf Gattungsebene und allen höheren taxonomischen Levels durchgeführt. Abbildung 14 zeigt schematisch die Vorgehensweise.



2.5.6 Programme für die Datenauswertung

Für die Auswertung der Daten wurden Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation) das Ökologische Statistikprogramm Primer6 (Version 6.1.16)/Permanova (Version 1.0.6) (Primer e) und das Open-Source Statistikprogramme R (Version 3.3.1) verwendet. Neben den Standardpaketen wurde hier noch zusätzlich das Paket „vegan“ verwendet. Die Biomarkeranalyse erfolgte mit dem Onlinetool LEfSe (LDA Effect Size) (<http://huttenhower.org/galaxy/>). Hierfür wurden die Standardeinstellungen genutzt.

Die Fragebögen der KraKi-Studie wurden mit der Inputmanagement-Software Teleform (Hewlett Packard) eingelesen und ebenfalls mit dem Open-Source Statistikprogramm R (Version 3.3.1) ausgewertet.

3 Ergebnisse

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Studien dargestellt. Zunächst werden die Resultate der Kariesverteilung bei Kindern in Braunschweig gezeigt. Anschließend wird einzeln auf die verschiedenen mikrobiologischen Studien eingegangen, die Ergebnisse gezeigt und abschließend werden diese Studien soweit möglich miteinander verglichen.

3.1 Statistische Analyse der Milchzahnkaries bei Kindern in Braunschweig

3.1.1 Longitudinale Analyse der dmft-Indizes

Zunächst wurden die gewichteten durchschnittlichen dmft-Index Werte der Jahre 2009 bis 2014 auf ihren Verlauf getestet. Es zeigte sich eine Verbesserung des dmft-Index über diesen Zeitraum von etwa 1,2 (2009) auf einen Wert von 1,0 (2014), wobei der beste Wert bei etwa 0,8 im Jahr 2013 festgestellt werden konnte (Abbildung 15). Bei genauerer Betrachtung dieser Daten auf Stadtteilebene konnten vier unterschiedliche Trajectories identifiziert werden. Drei dieser Trajectories zeigen eine Verbesserung des dmft-Index an, während ein Trajectory eine Verschlechterung zeigt (Abbildung 16A). Die Trajectories weisen Unterschiede in dem festgestellten dmft-Index auf. Während die Stadtteile mit dem höchsten dmft-Index im Norden und Westen des Zentrums der Stadt zu finden sind, liegen die Stadtteile mit dem niedrigsten dmft-Index mit wenigen Ausnahmen in den nördlichen und südöstlichen Randgebieten der Stadt. Demgegenüber konnten zwei Stadtteile identifiziert werden, in denen der dmft-Index über den untersuchten Zeitraum angestiegen ist. Diese beiden Stadtteile stehen nicht in direkter Nachbarschaft zueinander, befinden sich jedoch beide im nördlichen Stadtgebiet (Abbildung 16B).

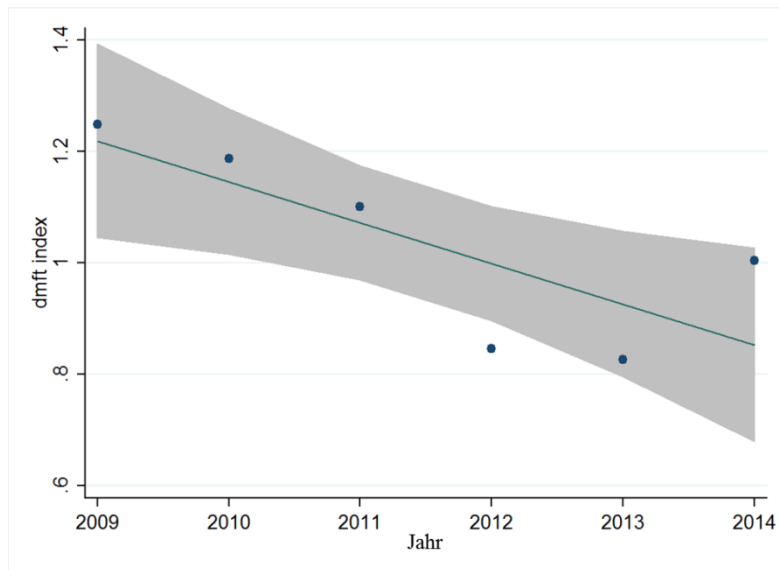


Abbildung 15: Verlauf des durchschnittlichen dmft-Index auf Stadtebene. Von 2009 bis 2014 ist eine Verbesserung des dmft-Index zu erkennen. Es zeigte sich ein linearer Verlauf, gekennzeichnet durch niedrige dmft Werte in den Jahren 2012 und 2013 und einem Anstieg im Jahre 2014.

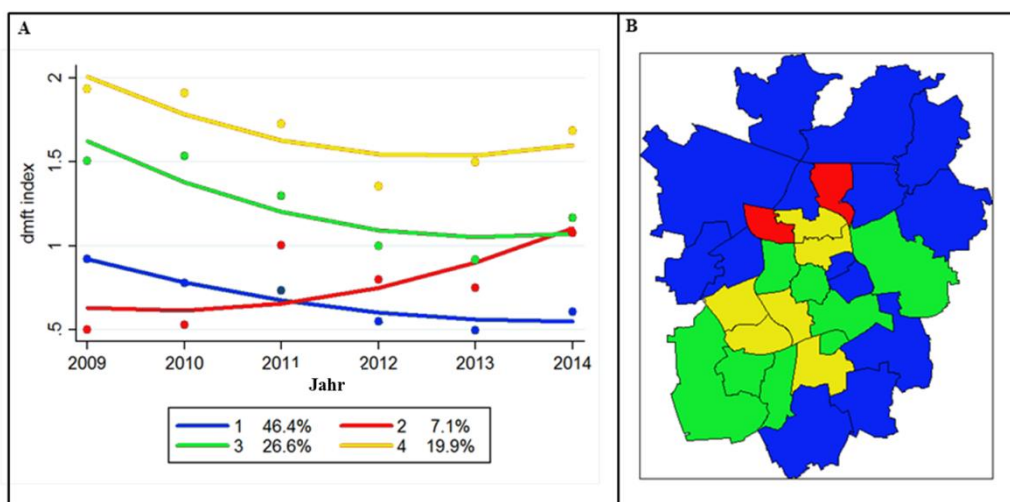


Abbildung 16: Trajectories der dmft-Indizes auf Stadtteilebene. A zeigt die unterschiedlichen zusammengefassten Verläufe. B stellt die einzelnen Kategorien der Verläufe auf der Stadtkarte dar. Drei Verläufe zeigen eine Abnahme auf unterschiedlichen Niveaus des dmft-Index, wohingegen ein Verlauf einen Anstieg darstellt. Die Stadtteile, die eine Verschlechterung des dmft-Index zeigen, liegen im Norden der Stadt.

3.1.2 Moran's I Test der dmft-Indizes auf Stadtteilebene

Anschließend wurde eine Moran's I Teststatistik durchgeführt, um zu sehen, ob eine Clusterung von hohen beziehungsweise geringen dmft-Indizes vorlag, oder die Verteilung zufällig war (Abbildung 17). Die Moran's I Test Statistik zeigte eine

Clusterung (0,3; $p=0,001$). Eine Aufschlüsselung der Stadtteile nach Namen ist in Tabelle 9 zu sehen.

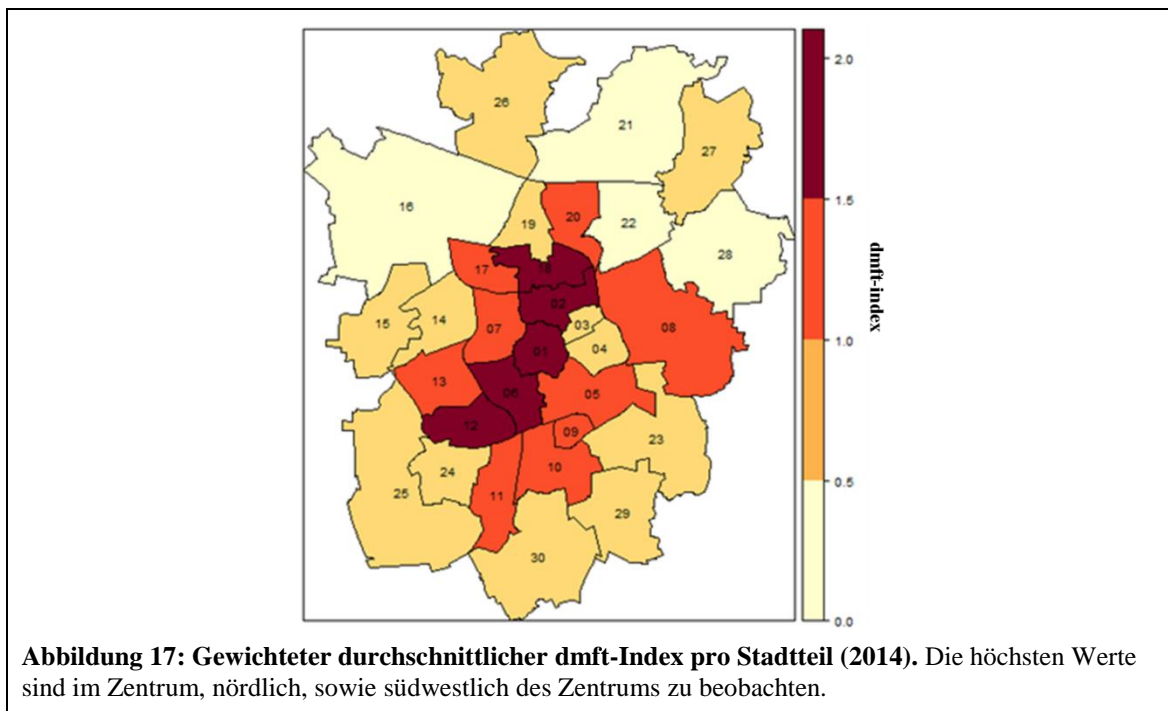


Tabelle 9: Planungsbereiche der Stadt mit entsprechenden Stadtteilnamen.

| Planungsbereich | Stadtteil Name | Planungsbereich | Stadtteil Name |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| 1 | Inenstadt | 16 | Veltenhof/Watenbüttel/Völkenrode |
| 2 | Uni-Viertel/Nordbahnhof | 17 | Ölper |
| 3 | Östliches Ringgebiet (Nord) | 18 | Schwarzer Berg/Siegfriedviertel |
| 4 | Östliches Ringgebiet (Süd) | 19 | Rühme |
| 5 | Bahnhofsviertel/Vierwegsgarten | 20 | Schuntersiedlung/Kralenriede |
| 6 | Westliches Ringgebiet (Süd) | 21 | Bienrode/Waggum/Bevenrode |
| 7 | Westliches Ringgebiet (Nord) | 22 | Querum |
| 8 | Gliesmarode/Riddagshausen | 23 | Rautheim/Südstadt/Lindenbergssiedlung |
| 9 | Bebelhof/Zuckerberg | 24 | Broitzem |
| 10 | Heidberg/Melverode | 25 | Timmerlah/Stiddien/Geitelde |
| 11 | Rüningen/Gartenstadt | 26 | Wenden/Thune/Harxbüttel |
| 12 | Weststadt (Süd) | 27 | Hondelage |
| 13 | Weststadt (Nord) | 28 | Dibbesdorf/Volkmarode/Schapen |
| 14 | Lehndorf | 29 | Mascherode |
| 15 | Lamme/Kanzlerfeld | 30 | Stöckheim/Leiferde |

3.1.3 Spatial lag Modell

Nach Aufschlüsselung der dmft-Indizes nach Jahr und Stadtteil, sowie der identifizierten Clusterung hoher Werte wurde ein räumliches Modell gewählt, um verschiedene Einflussfaktoren für hohe dmft-Werte zu identifizieren. Wie bereits unter 3.1.1 eingeführt, sind die Daten in einem linearen Modell auszuwerten. Somit wurde ein spatial lag Modell gewählt (Details siehe 2.2.5). Zunächst wurde für das spatial lag model „Modell 1“ ausschließlich der dmft-Index als Variable ausgewählt. Hier zeigte sich übereinstimmend zum Moran's I eine Clusterung des dmft-Index ($\rho=0,54$; $p=0,02$). Anschließend wurden zunächst einzeln und abschließend zusammen die beschreibenden Variablen (Anteil der arbeitslosen Personen und Anteil der Personen mit Migrationshintergrund) in das Modell mit einbezogen. So zeigte sich in Modell 2, dass auch bei Hinzunahme des Anteils der arbeitslosen Personen pro Stadtteil eine Clusterung der Werte zu beobachten war ($\rho=0,23$; $p=0,28$). Ebenfalls war zu sehen, dass pro 1% Anstieg der arbeitslosen Personen pro Stadtteil der dmft-Index um 0,124% ansteigt ($\beta=0,124$). In Modell 3 wurde neben dem dmft-Index der Anteil der Personen mit Migrationshintergrund pro Stadtteil integriert. Auch hier konnte eine Clusterung der Werte identifiziert werden unter Hinzunahme einer weiteren Variablen ($\rho=0,23$; $p=0,28$). Im Vergleich zu Modell 2 ist bei Modell 3 der Anstieg des dmft-Index pro 1% Zunahme der Co-Variablen (Anteil der Personen mit Migrationshintergrund) geringer und liegt bei 0,038% ($\beta=0,038$). Modell 4 zeigt das abschließende Modell mit beiden Co-Variablen verknüpft mit dem dmft-Index. Auch hier ist eine Clusterung der Variablen vorhanden ($\rho=0,15$; $p=0,47$). Hinsichtlich des Einfluss auf den dmft-Index der Co-Variablen zeigt sich ein ähnliches Bild, wie bereits in Modell 2 und Modell 3 beschrieben. Pro 1% Anstieg der arbeitslosen Personen nimmt der dmft-Index 0,073% zu ($\beta=0,073$) und pro 1% Anstieg der Personen mit Migrationshintergrund ist ein Anstieg von 0,023% zu messen ($\beta=0,023$). Alle Modelle und gewählten Variablen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Spatial Lag Modell. Es wurden vier unterschiedliche Modelle berechnet. Neben dem dmft-Index wurden in jedem Modell unterschiedliche Variablen miteinbezogen.

| | Co-Variable | $\hat{\beta}$ | p | CI ¹⁾ 95% unten | CI ¹⁾ 95% oben | Rho (ρ)* |
|-----------------|---|---------------|------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Modell 1 | Ohne | | | | | 0.54 (p=0.02) |
| Modell 2 | Anteil der arbeitslosen Personen (16-65)** | 0.124 | 0 | 0.075 | 0.173 | 0.23 (p=0.28) |
| Modell 3 | Anteil der Personen mit Migrationshintergrund** | 0.038 | 0 | 0.022 | 0.053 | 0.23 (p=0.28) |
| Modell 4 | Anteil der arbeitslosen Personen (16-65)** | 0.073 | 0.03 | 0.006 | 0.139 | 0.15 (p=0.47) |
| | Anteil der Personen mit Migrationshintergrund ** | 0.023 | 0.03 | 0.001 | 0.044 | |

* Koeffizient für räumliche Autokorrelation

** Pro 1% Anstieg

¹⁾ CI – Konfidenz Intervall

Zusammengefasst bedeuten diese Ergebnisse, dass einerseits Karies an Milchzähnen vermehrt in den zentrumsnahen Stadtteilen im Westen und Südwesten auftrat und andererseits sowohl der Anteil der Arbeitslosigkeit pro Stadtteil und der Anteil der Personen mit Migrationshintergrund als Ursache für diese räumliche Verteilung gewertet werden konnten. Es ist zu beachten, dass mit dieser Studie diese beiden Faktoren nicht als Risikofaktoren für die Karies selbst identifiziert werden konnten.

3.2 Überblick über die Ergebnisse der Mikrobiom-Sequenzierung aller Studien

Da alle erhaltenen Sequenzen aus allen vier unterschiedlichen Projekten miteinander vergleichbar waren (V1-V2 Region der 16S rDNA), wurden diese gemeinsam bioinformatisch zu OTUs geclustert, zusammengefasst und mit entsprechenden Datenbanken eine taxonomische Zuordnung vorgenommen (siehe 2.5.4 ff). Insgesamt konnten von den 680 Proben (KraKi: 118 Proben, Zahnmikrobiom indonesischer Kinder: 72 Proben, Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies: 392 Proben, Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen: 98 Proben) 314 Proben für die weiteren Analyse genutzt werden (KraKi: 38 Proben, Zahnmikrobiom indonesischer Kinder: 57 Proben, Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies: 151 Proben, Variabilität des oralen Mikrobioms bei

gesunden erwachsenen Personen: 68 Proben), da sie den zuvor festgelegten Kriterien (mehr als 4500 reads pro Probe) entsprachen. Die Sequenziertiefe wurde mit 4.500 reads pro Probe festgelegt, weil somit eine große Anzahl vorwiegend der klinischen Proben dieses Kriterium erfüllte. Wäre ein strengeres Kriterium (etwa 10.000 reads pro Probe) festgelegt worden, so wären 364 Proben (von 392 Proben) aus der Analyse herausgefallen.

Insgesamt wurden bei allen 314 den Kriterien entsprechenden Proben 4,6 Millionen reads produziert. Tabelle 11 zeigt die Aufteilung der reads auf die einzelnen Projekte, sowie die durchschnittliche Anzahl an reads pro Probe und die Anzahl der OTUs pro Projekt.

Tabelle 11: Anzahl der reads pro Projekt und der Median der reads pro Probe, sowie die Anzahl der Proben.

| Studie/Projekt | Gesamte Anzahl an reads | Median der reads pro Probe (mit Standardabweichung) | Anzahl der Proben | Anzahl OTUs |
|--|-------------------------|---|-------------------|-------------|
| KraKi-Studie | 908.064 | 14.333 (± 13.736) | 38 | 455 |
| Zahnmikrobiom indonesischer Kinder | 1.373.606 | 17.916 (± 19.104) | 57 | 592 |
| Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies | 1.170.625 | 6.819 (± 4449) | 141 | 431 |
| Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen | 1.215.406 | 10.880 (± 10.388) | 37 | 559 |

Insgesamt wurden 954 OTUs aus den Sequenzierdaten gewonnen. Die Anzahl der OTUs pro Projekt lag zwischen 431 (Klinische Proben) und 592 (Zahnmikrobiom indonesischer Kinder). Mehr als 70% der vorhandenen 954 OTUs konnten bis auf die Gattungs- oder Artebene identifiziert werden (Abbildung 18).

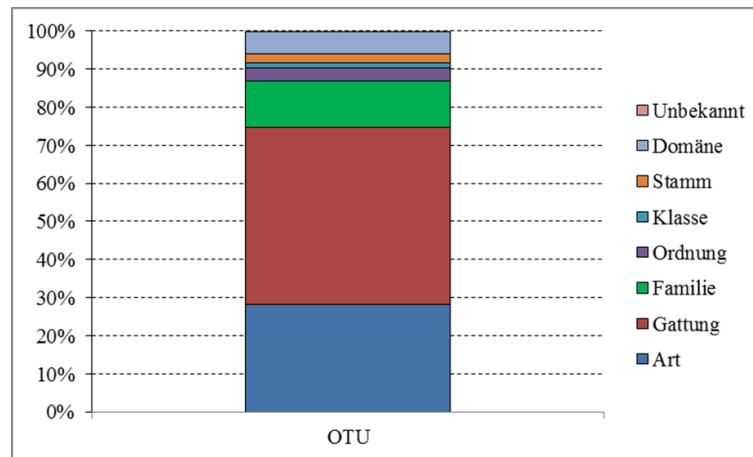


Abbildung 18: Taxonomische Zuordnung der OTUs. Etwa 75% der gesamten OTUs konnten bis zur Gattungs- oder Artebene bestimmt werden. Lediglich ein kleiner Teil der OTUs (weniger als 1%) konnte nicht zugeordnet werden.

Insgesamt konnten 195 verschiedene Arten festgestellt werden. Diese Arten, sowie alle weiteren OTUs teilten sich auf 218 unterschiedliche Gattungen, 115 Familien, 58 Ordnungen, 33 Klassen und 16 Stämme auf (Abbildung 19).

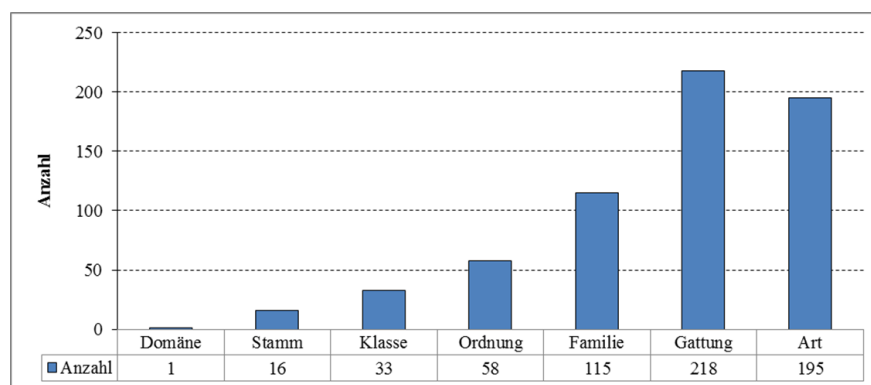
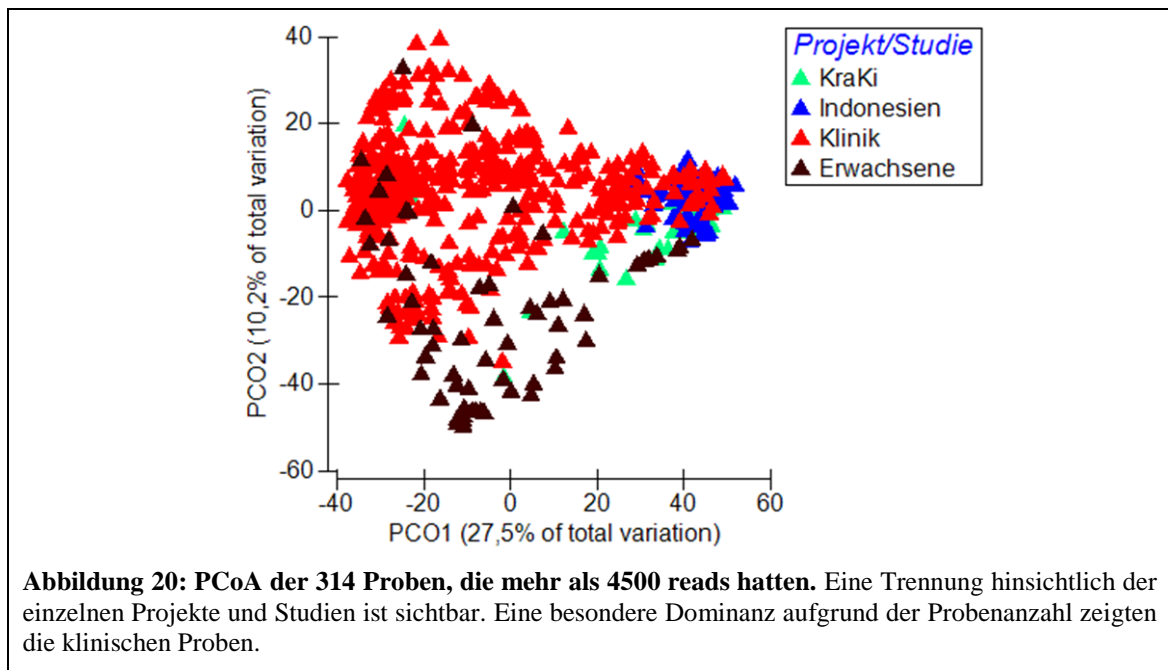


Abbildung 19: Taxonomische Diversität der Proben. Die identifizierten OTUs konnten einer Domäne zugeordnet werden (Bacteria). Insgesamt wurden 16 unterschiedliche Stämme und 33 Klassen gefunden. Diese konnten 58 Ordnungen und 115 Familien unterwiesen werden. 218 verschiedene Gattungen und insgesamt 195 verschiedene Arten wurden identifiziert.

Die Betrachtung aller Proben aufgeteilt nach den einzelnen Projekten zeigten deutliche Trennungen. So konnten mit der PCoA die Proben der KraKi-Studie und des Projektes zum Zahnmikrobiom indonesischer Kinder als ein Cluster festgestellt werden. Die klinischen Proben zeigten sich ähnlich breit gestreut, wie die Proben von den gesunden erwachsenen Personen. Die beiden Hauptkomponenten der Principal Coordinate Analysis (Hauptkomponentenanalyse/PCoA) erklären insgesamt 37% der gesamten Variabilität des Mikrobioms (Abbildung 20).



3.3 KraKi

3.3.1 Rekrutierung und Studienpopulation

Für die Rekrutierung der Teilnehmer wurden die Kindergärten und Kindertagesstätten in Braunschweig ausgewählt. Im Jahr 2014 gab es 151 Kindergärten und Kindertagesstätten im gesamten Stadtgebiet mit etwa 6800 Kindern zwischen einem und sechs Jahren. Nach Erteilung der Erlaubnis in oben genannten Stätten teilnehmende Familien rekrutieren zu dürfen blieben noch 75 Einrichtungen mit etwa 4000 Kindern. Die Verteilung dieser Einrichtungen war über das Stadtgebiet verteilt (Abbildung 21).



Abbildung 21: Teilnehmende Kindergärten und Kindertagesstätten an der KraKi-Studie.

Insgesamt wurden 5000 Flyer mit frankierten Antwortkarten verteilt und ausgelegt (siehe 2.3 und Anhang 1). Die Antwort diente als Interessensbekundung. Insgesamt lagen 341 (7%) Interessensbekundungen vor, von denen tatsächlich 201 (4% aller über Flyer etc. kontaktierten Personen) Familien an der Studie teilgenommen haben. 121 haben hiervon auch ihre Zustimmung an einer Entnahme von Zahnabstrichen bei ihren Kindern gegeben haben (Abbildung 22).

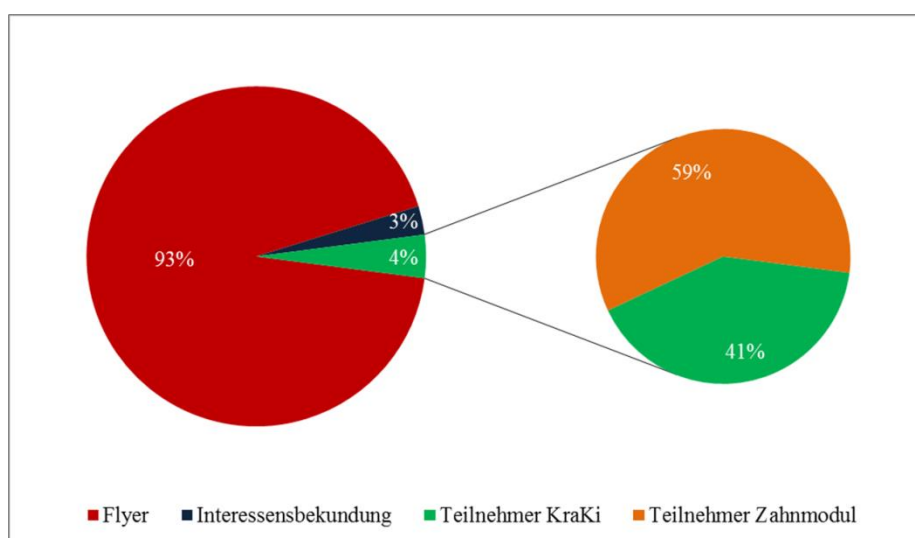
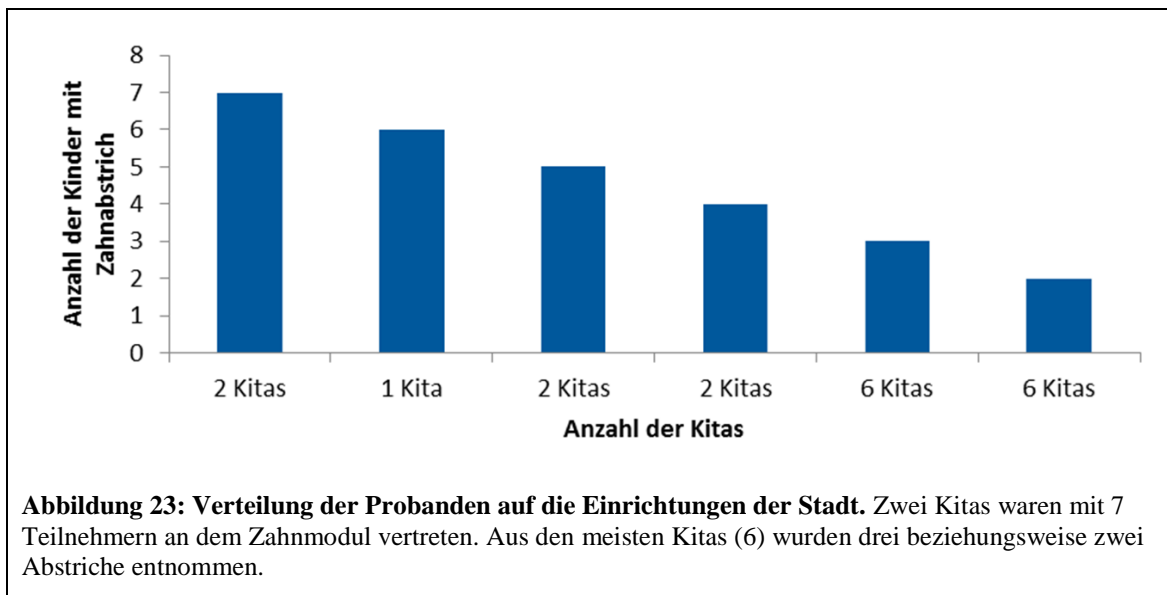


Abbildung 22: Response der Teilnehmer an der Studie. Von 5000 verteilten Flyern haben 7% der empfangenen Personen ihr Interesse an der Studie bekundet. Die tatsächliche Response lag bei 4%, 3% der ursprünglichen Interessenten haben nicht an der Studie teilgenommen. Von diesen 4% haben wiederum 59% an dem Zahnmodul teilgenommen.

Die höchste Anzahl an Probanden pro Einrichtung lag bei sieben (2 Einrichtungen) und die geringste Anzahl bei drei (6 Einrichtungen) (Abbildung 23). Von den 121

Probanden waren am jeweiligen Tag der Untersuchung insgesamt 81 (67%) anwesend. Die übrigen Probanden waren krank oder nicht anwesend am Tag der Untersuchung.



3.3.2 Fragebogendaten

Im folgenden Abschnitt wird auf die erhobenen Fragebogendaten der teilnehmenden Familien des Zahnmoduls eingegangen.

3.3.2.1 Baselinefragebogen

Bildungsgrad

Bei mehr als 70% der teilnehmenden Haushalte war der höchste Bildungsgrad mindestens ein (Fach-) Hochschulabschluss. Weniger als 20% der teilnehmenden Haushalte zeigten einen Bildungsgrad ohne (Fach-)Hochschulabschluss und lediglich 7% haben auf diese Frage nicht geantwortet (Abbildung 24 A).

Haushaltseinkommen

Das Haushaltseinkommen der teilnehmenden Haushalte lag in mehr als der Hälfte zwischen 3000€ und 5000€ und mehr monatlich. Etwa ein Viertel (27%) hat keine Angabe zu dem Einkommen gegeben. Etwa 15% der teilnehmenden Haushalte hatte ein Einkommen unter 3000€ (Abbildung 24 B)

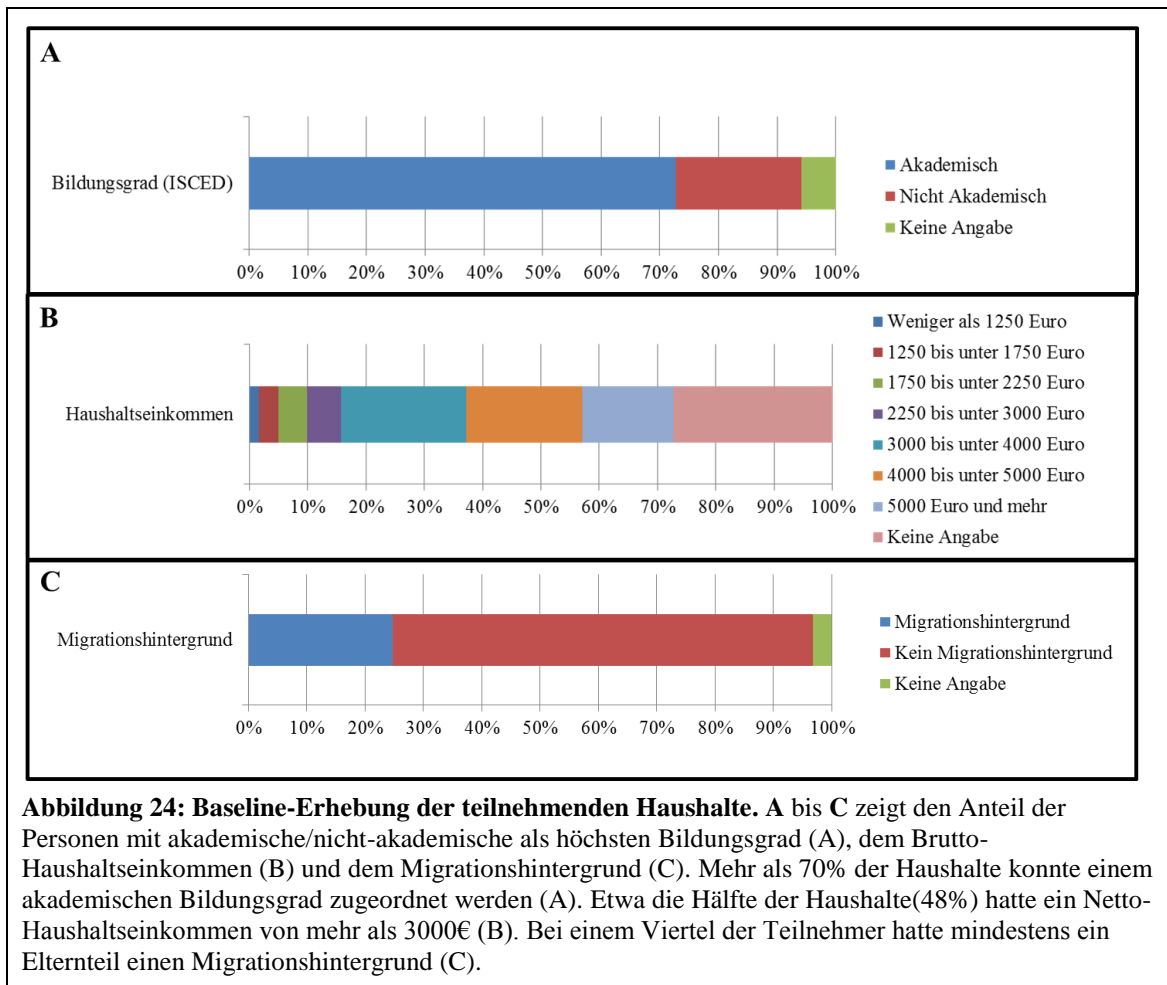
Migrationshintergrund

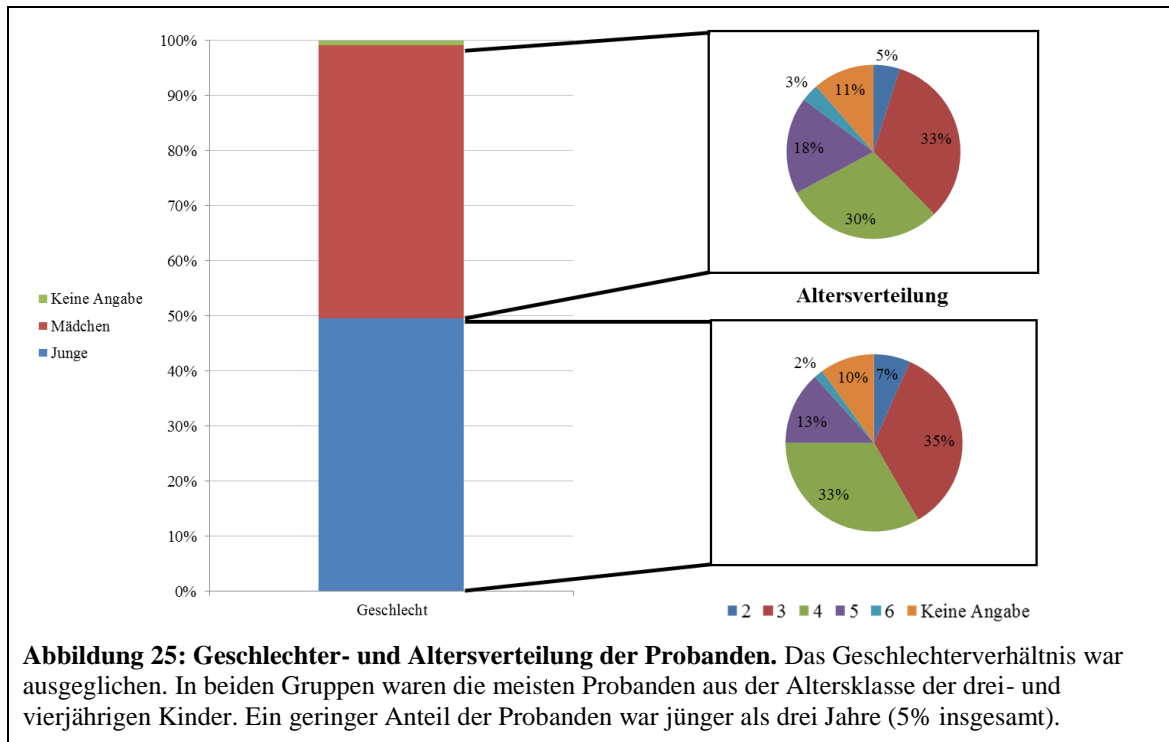
Bei einem Viertel der Haushalte (25%) war mindestens eines der beiden Elternteile nicht-Deutsch und wies somit einen Migrationshintergrund auf. Bei 70% der Haushalte

waren alle Personen Deutsch. Lediglich ein geringer Anteil (5%) der Teilnehmer hat die Frage nicht beantwortet Abbildung 24 C).

Probandendaten

Die Geschlechterverteilung der Probanden war gleichmäßig verteilt (Jungen 49%, Mädchen 49%). Etwa drei Viertel (76%) der Probanden waren drei oder vier Jahre alt. Diese Aufteilung ist auch innerhalb der Geschlechter erkennbar (Abbildung 25).





3.3.2.2 Zahnfragebogen

In diesem Teil werden die Fragebogendaten aller 121 Teilnehmer des Zahnmoduls gezeigt. Während alle Teilnehmer angaben, dass ihre Kinder 20 Zähne haben und lediglich vier Kinder eine Karieserkrankung nachzuweisen hatten, zeigte sich ein Unterschied bei der Häufigkeit der Zahnarztbesuche. Mehr als 30% gaben an entweder alle sechs Monate oder mindestens einmal im Jahr zum Zahnarzt zu gehen (Abbildung 27). Etwa ein Viertel (24%) gab an, dass die letzte Untersuchung nicht ganz ohne Probleme abgelaufen ist. Bei lediglich 5% der teilnehmenden Kinder war mindestens ein Zahn gefüllt. Annähernd die Hälfte der Teilnehmer (49%) hat früher Fluoridtabletten präventiv für die Kariesprävention oder Stärkung der Zähne verabreicht bekommen. Hinsichtlich einer vorhandenen Appte gaben ebenfalls etwa ein Viertel (22%) der Eltern/Erziehungsberechtigten an, dass ihre Kinder ein oder mehrmals diese Erfahrung gemacht haben.

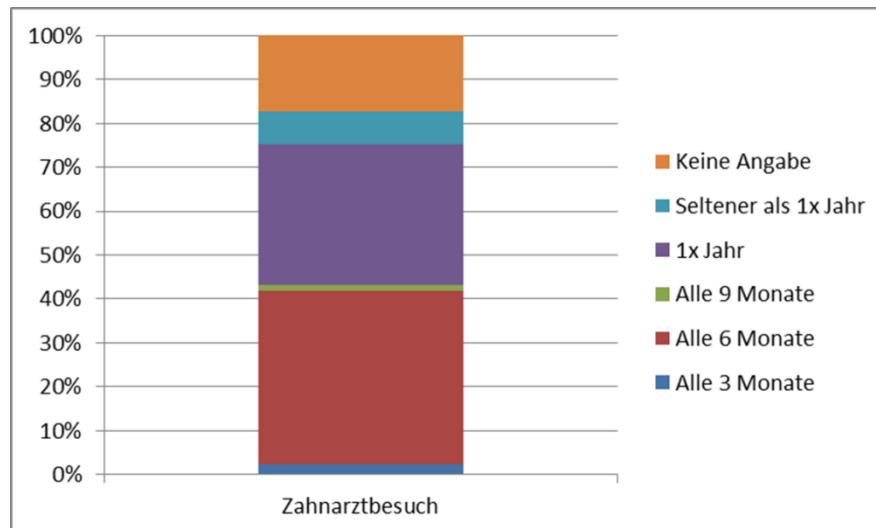


Abbildung 26: Zahnarztbesuche pro Jahr. Ein Großteil der Eltern/Erziehungsberechtigten der Teilnehmer (60%) war mindestens 1-2x im Jahr beim Zahnarzt. 7% gaben an seltener als 1x im Jahr mit ihren Kindern zum Zahnarzt zu gehen.

Nahezu zwei Drittel (61%) aller Teilnehmer putzen sich mindestens zwei Mal am Tag zu Hause die Zähne. Die Hälfte (51%) der Teilnehmenden gab an, dass zwei beziehungsweise drei Minuten Zähneputzen daheim vollzogen wird. Während 83% der Eltern angaben, ihre Kinder bei dem Zähneputzen zu unterstützen, ist dies bei 7% nicht der Fall. Mehr als zwei Drittel der Teilnehmenden benutzten manuelle Zahnbürsten (71%) und nur ein Fünftel gab an, elektrische Zahnbürsten zu nutzen (11%). In den Kindergärten werden nach Angabe der Teilnehmer am häufigsten ein (37%) bis zwei (35%) Mal am Tag die Zähne geputzt, wobei die Putzdauer bei über der Hälfte (51%) der Teilnehmer nicht bekannt war.

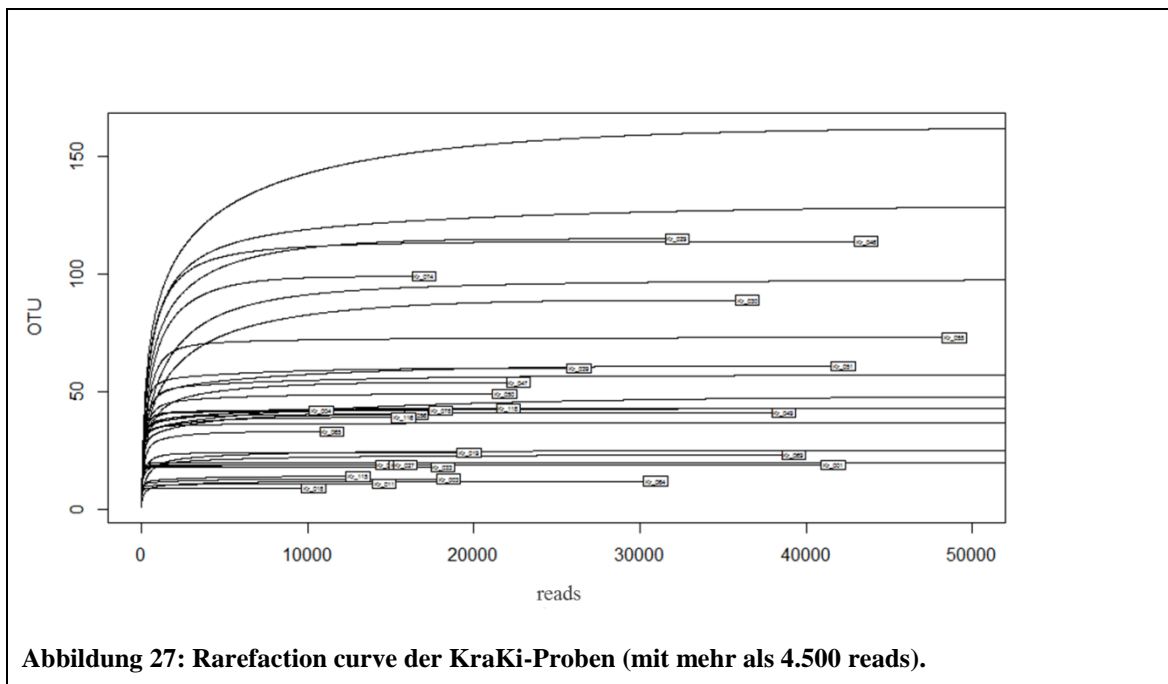
3.3.3 Zahnmikrobiom der Probanden

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Probenanalyse gezeigt und Verknüpfungen zu den Fragebogendaten hergestellt. Die Proben wurden mittels der variablen Regionen 1 und 2 der 16S rDNA auf ihre bakterielle Zusammensetzung getestet (Details siehe 2.5 ff). Von den 81 entnommenen Proben entsprachen 30 dem definierten Qualitätskriterium von 4.500 reads pro Probe. Die folgenden Ergebnisse sind ausschließlich von diesen Proben gezeigt. Keine der entnommenen Proben, die den Qualitätskriterien entsprachen, stammte von kariösen Zähnen.

3.3.3.1 Qualität der Proben

Nach Ausschluss aller Proben mit weniger als 4.500 reads wurde von den verbliebenen 30 Proben (von 81) eine sogenannte ‚rarefaction curve‘ angefertigt. Die Proben zeigten allesamt ein Plateau. Die Anzahl der identifizierten OTUs pro Probe reichte von 15 bis

über 150. Mit Ausnahme von acht Proben, die mehr OTUs aufwiesen, zeigten die restlichen Proben zwischen 15 und 55 OTUs (Abbildung 27). Alle Proben zeigten mehr als 10.000 reads, wobei das Maximum (Probe 12) bei 54.890 reads lag.



Anschließend wurden die 50 häufigsten OTUs nach Häufigkeit absteigend sortiert. Es zeigte sich, dass das häufigste OTU der Gattung *Streptococcus* (OTU_514) zugeordnet werden konnte (9%), gefolgt von *Neisseria* (OTU_11) (6%) und einer erneut *Streptococcus* (OTU_9) (5,5%) (Abbildung 28). Es konnten 25 OTUs identifiziert werden, die mehr als 1% der Proben ausgemacht haben.

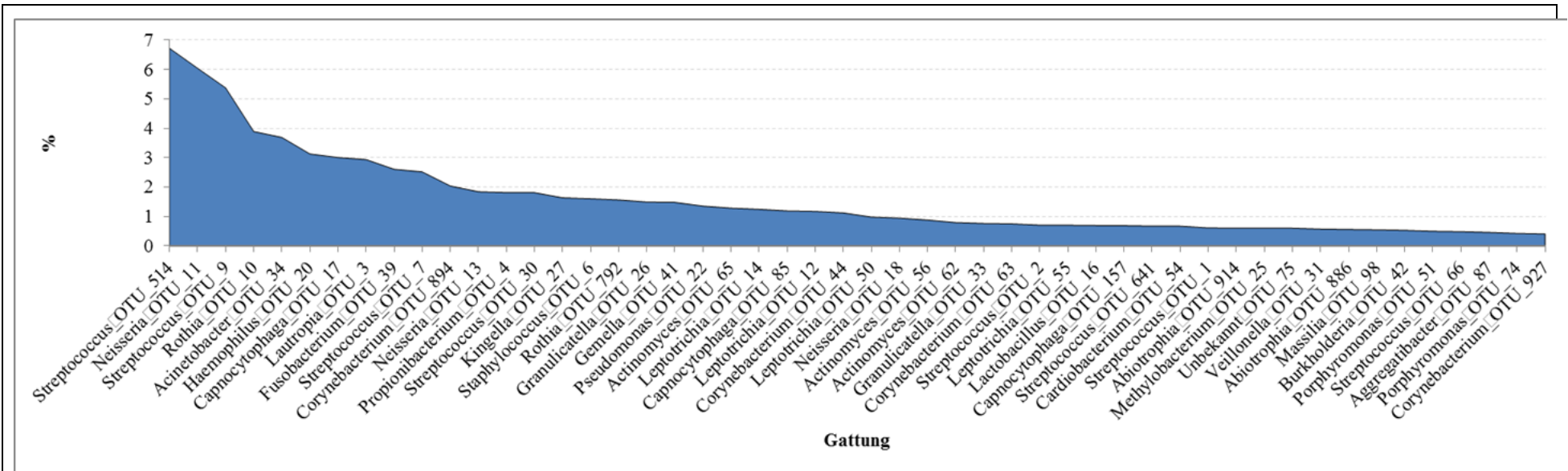
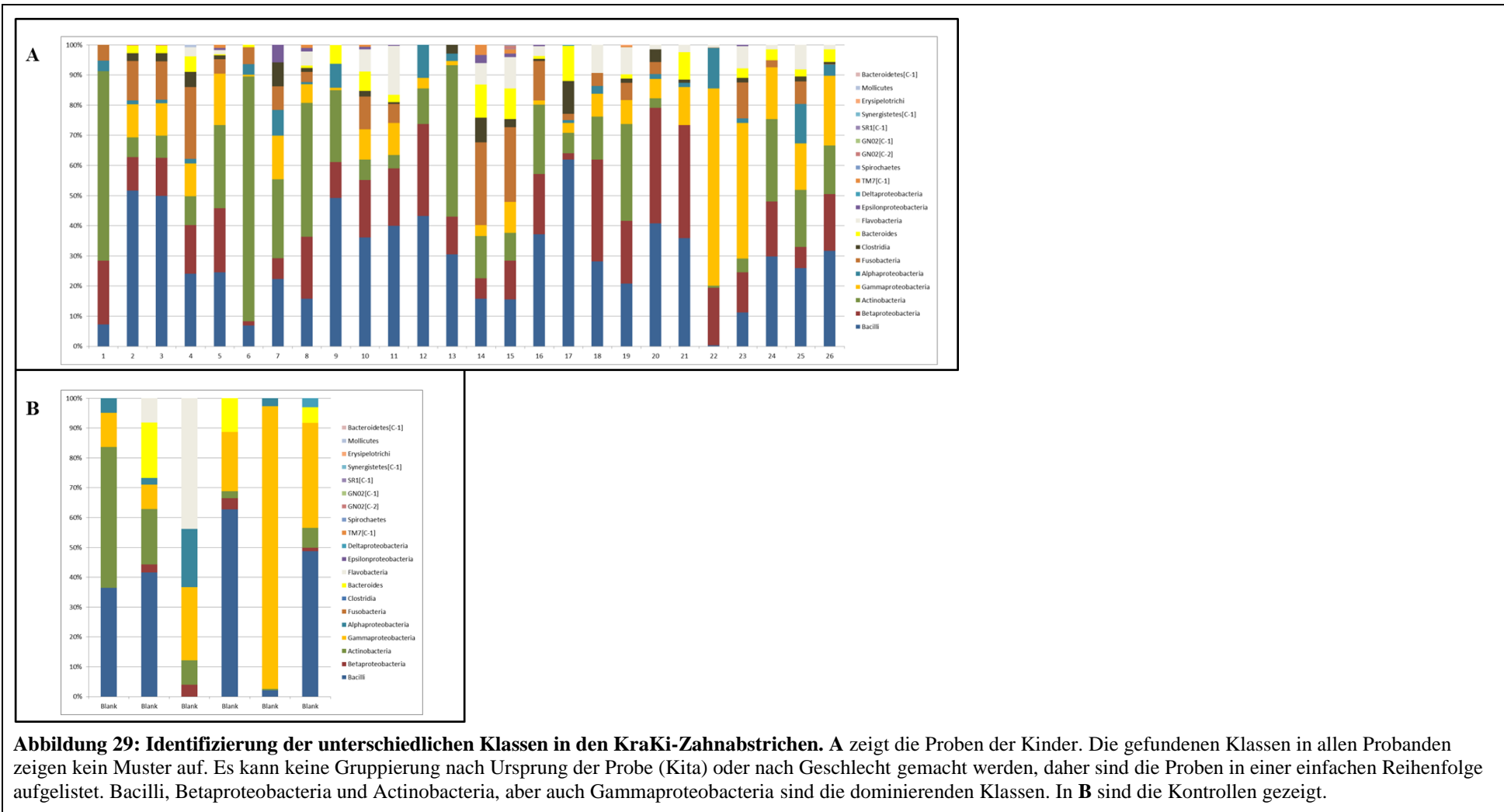


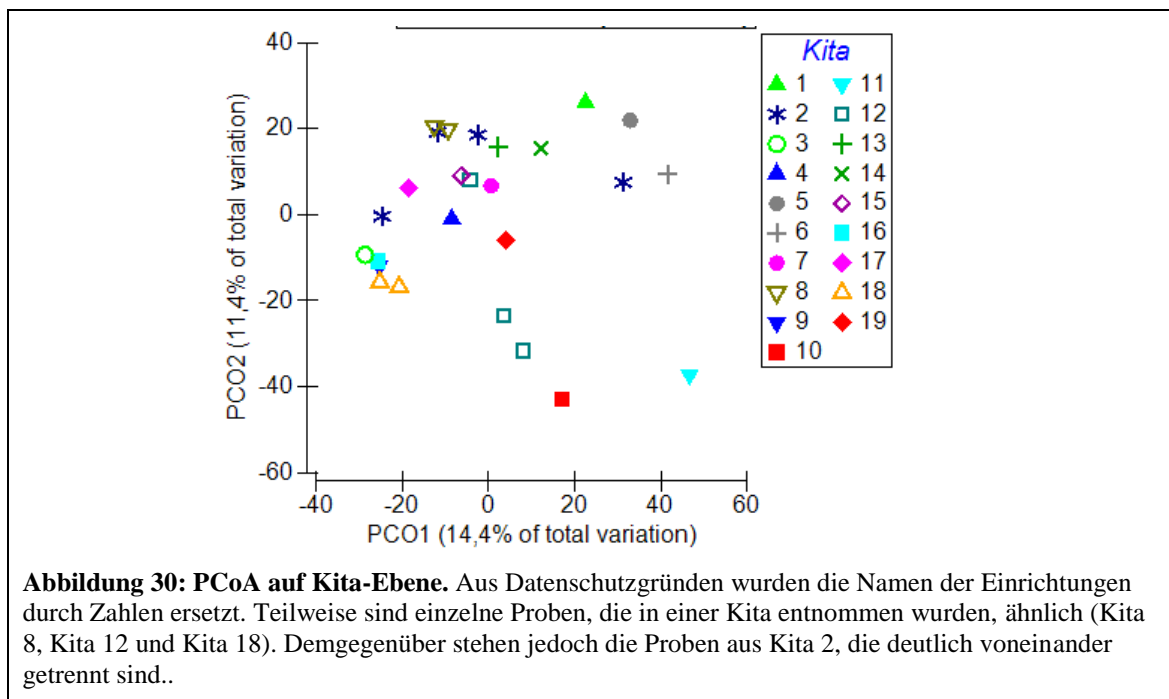
Abbildung 28: Rang-Häufigkeitskurve der identifizierten OTUs in den KraKi-Proben (Top 50). Die häufigsten Gattungen waren *Streptococcus*, *Neisseria* und *Rothia*. 25 OTUs waren durchschnittlich häufiger als 1% in allen Proben vertreten.



Ein Vergleich der Proben auf Ebene der identifizierten Klassen zeigte ein heterogenes Bild mit einer Dominanz der Klassen Bacilli, Betaproteobacteria und Actinobacteria, die in einer Vielzahl der Proben nahezu 50% beschreiben konnten (Ausnahmen Proben 14, 15 und 22, 23) (Abbildung 29A). Im Vergleich zu den entnommenen Zahnabstrichen zeigten die vier erhaltenen Negativkontrollen eine andere Verteilung der OTUs auf Ebene der Klassen (Abbildung 29B). Die sechs Negativkontrollen stammten aus Einrichtungen, wo keine der entnommenen Proben die Qualitätskriterien erfüllte. Daher wurden sie in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt.

3.3.3.2 Hauptkomponentenanalyse

Für den Vergleich der Proben und die Ähnlichkeit zueinander wurde eine Ähnlichkeitsanalyse ausgewählt (Principle Coordinate Analysis/PCoA) (Details siehe 2.5.4). Ziel dieser Analyse war es Ähnlichkeiten von Proben zu identifizieren und diese näher zu charakterisieren. Zunächst wurden die Proben nach der Herkunft, also der besuchten Einrichtung der Kinder betrachtet. Es zeigte sich keine Gruppierung nach der Herkunft der Probe. Die beiden Hauptkomponenten erklären insgesamt etwa 26% der Variabilität des Mikrobioms (Abbildung 30).



Anschließend wurden die Proben hinsichtlich des Geschlechts der Probanden mit derselben Methode betrachtet (Abbildung 31). Auch hier ist keine Gruppierung der Proben erkennbar. Auch eine LDA konnte keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern identifizieren.

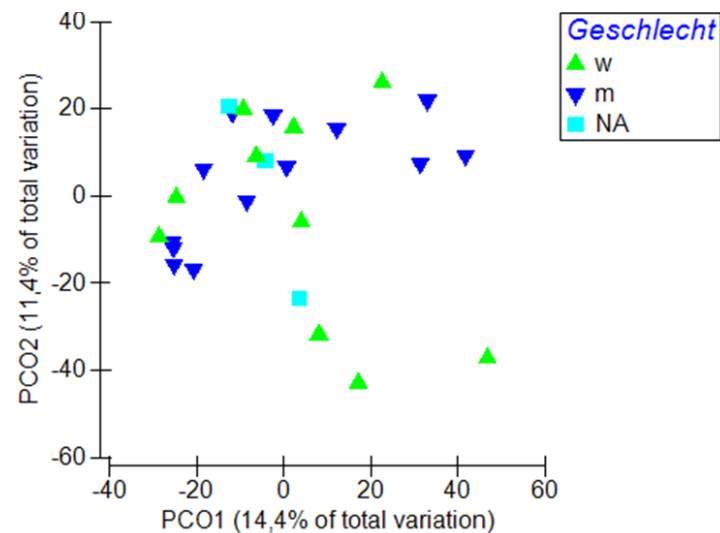


Abbildung 31: PCoA KraKi Geschlecht. Eine Trennung der Proben nach Geschlecht war nicht erkennbar.

Bei Betrachtung der Proben unter Berücksichtigung des Alters der Probanden zeigte ebenfalls keine Gruppierung und auch die LDA zeigte kein Ergebnis (Abbildung 32).

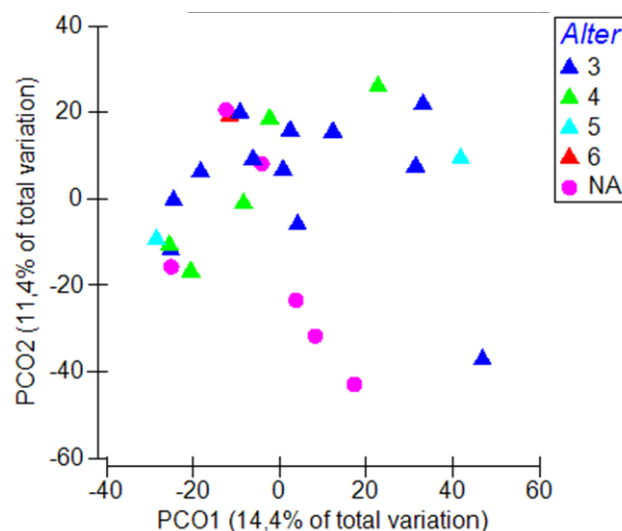


Abbildung 32: PCoA Alter. Das Alter führte zu keiner Auftrennung der Proben.

3.3.3.3 Shannon-Diversität

Als Maß für die Diversität innerhalb der Proben wurde der Shannon-Diversitäts Index ausgewählt. Dieser wurde nach den beiden Geschlechtern (männlich/weiblich) beziehungsweise den Proben, bei denen das Geschlecht nicht bekannt war (keine Angabe der Eltern im Fragebogen), aufgetrennt. Bei allen Proben lag der Median des Index bei etwa 3. Es konnten keine Unterschiede identifiziert werden (Abbildung 33).

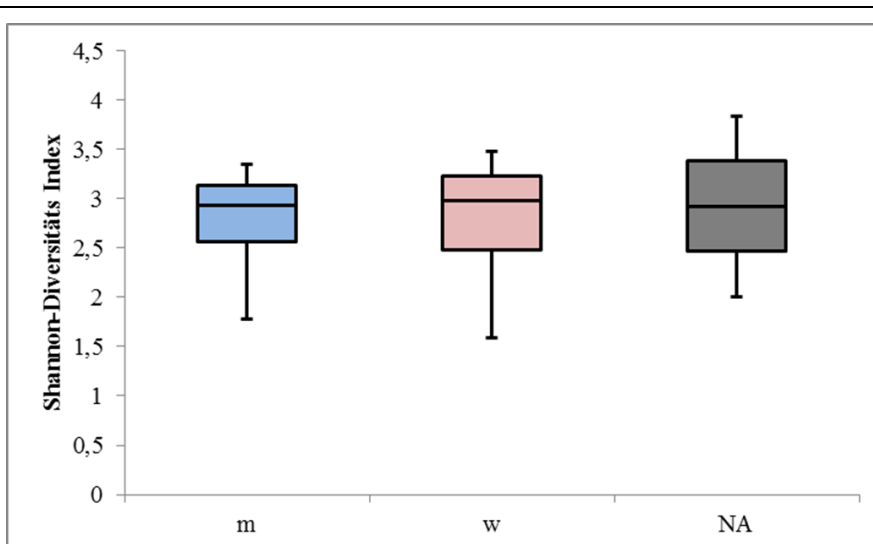


Abbildung 33: Shannon-Diversitäts Index der KraKi-Proben aufgetrennt nach Geschlechtern. Die Diversität in den Proben ist sowohl bei den männlichen Teilnehmern (m), als auch bei den weiblichen Teilnehmern (w) ähnlich. Ebenso stimmt die Diversität der Proben von Teilnehmern ohne Geschlechtsangabe hiermit überein. Der Mittelwert liegt bei etwa 3.

Zusammenfassend konnte mit der KraKi-Studie gezeigt werden, dass die Eltern regelmäßig zu Zahnarztbesuchen gehen. Ebenso werden die Kinder von ihren Eltern häufig bei dem Zähneputzen unterstützt. Die teilnehmenden Familien sind häufig wohlhabend und gebildet. Keine der Proben wurde von kariösen Zähnen entnommen und insgesamt zeigte sich eine gesunde Studienpopulation mit lediglich 5% der Kinder mit Karies. Auf mikrobieller Ebene war kein Unterschied zwischen Jungen und Mädchen hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung erkennlich. Auch eine Auftrennung hinsichtlich unterschiedlicher Altersgruppen konnte nicht vorgenommen werden. Die häufigsten gefundenen Gattungen konnten *Streptococcus*, *Neisseria* und *Rothia* zugeordnet werden. Auf Klassenebene wurden die Proben dominiert von Bacilli, Betaproteobacteria und Actinobacteria.

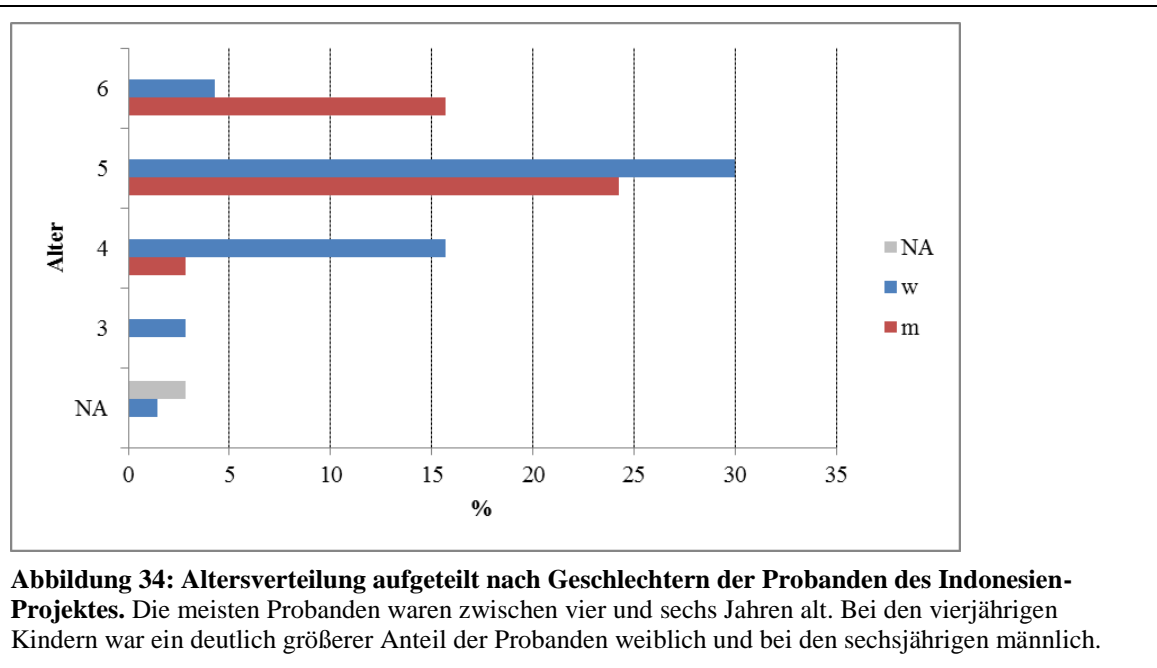
3.4 Zahnmikrobiom indonesischer Kinder

Die Abstriche der Kinder aus Indonesien wurden im Rahmen einer jährlichen Untersuchung in einer Einrichtung für alleinerziehende Mütter und ihre Kinder durchgeführt. Hintergrund dieser Untersuchung ist es, die Zahngesundheit und die Mundhygiene kontinuierlich zu verbessern.

3.4.1 Probanden

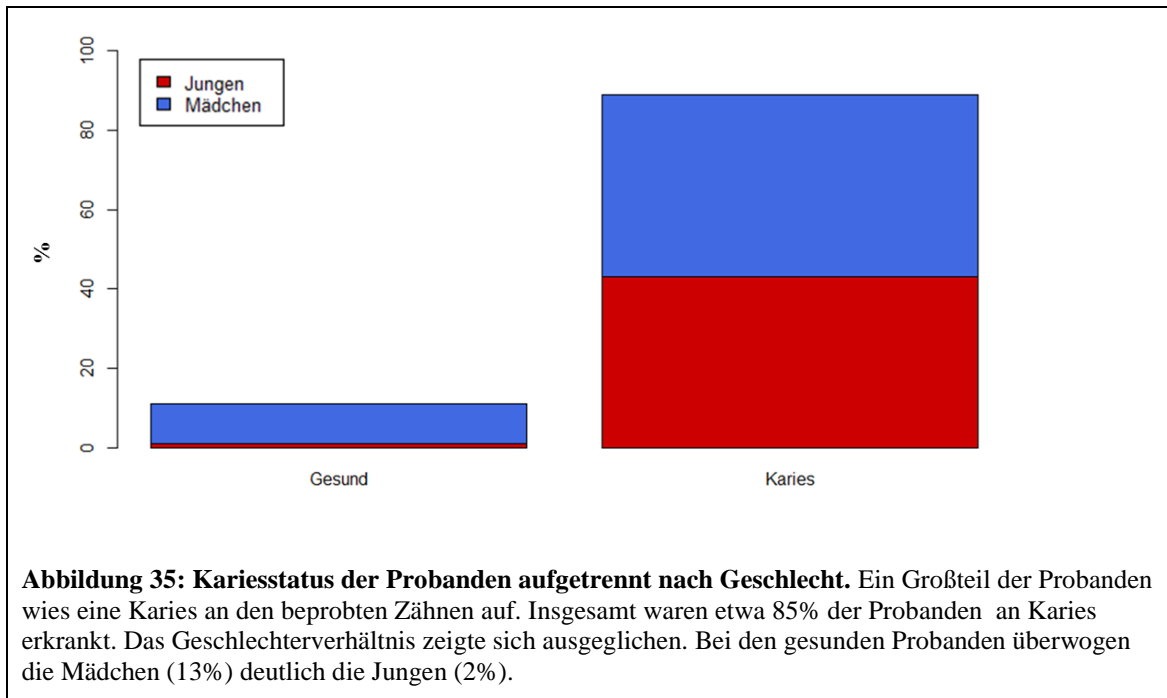
Im Rahmen einer Baseline-Erhebung der Probandendaten wurde nach dem Alter und dem Geschlecht der Kinder gefragt. Die Geschlechterauftrennung zeigte sich als gleichmäßig verteilt (44% Jungen/56% Mädchen).

Die meisten Probanden waren fünf Jahre alt (Mädchen 30%/Jungen 24%). Die nächsthäufige Altersstufe waren die sechsjährigen, wobei hier ein großer Anteil Jungen waren (15%) im Vergleich zu den Mädchen (4%). Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei den Vierjährigen. Die Mädchen waren hier mit 16% im Vergleich zu 3% bei den Jungen deutlich in der Überzahl. Bei den Dreijährigen gab es ausschließlich Mädchen (3%) (Abbildung 34).



3.4.1.1 Karies-Status der Probanden an den beprobten Zähnen

Der Kariesstatus an den beprobten Zähnen zeigte sich als sehr homogen. Nahezu alle Probanden wiesen eine Form der Karies auf. Insgesamt waren lediglich 16% der Probanden gesund, also ohne Karies an den vestibulären Incisivi. Diese verteilten sich auf 1% der Jungen und 15% der Mädchen. 84% der Probanden hatten einen oder mehrere kariöse Zähne von denen das Geschlechterverhältnis etwa gleichmäßig verteilt war (Mädchen 40% /Jungen 43%) (Abbildung 35). Die Altersverteilung der Probanden mit Karies war ebenfalls auf alle Altersstufen gleichmäßig verteilt (Daten sind nicht gezeigt).



3.4.2 Zahnmikrobiom der Probanden

Die Mikrobiomanalyse erfolgte wie unter 2.5 ff. In die Analyse wurden alle Proben mit mehr als 4.500 reads pro Probe einbezogen. Von den 70 Proben erfüllten sechs nicht dieses Kriterium. Die Anzahl der identifizierten OTUs pro Probe lag zwischen 25 und 255 (Abbildung 36). Der Großteil der Proben hatte eine OTU-Anzahl im Größenbereich zwischen 25 und 75 OTUs pro Probe.

Bei Betrachtung nach Häufigkeit der in den Proben vertretenen Gattungen zeigte sich, dass *Neisseria* (OTU_11) am häufigsten in allen Proben gefunden werden konnte (6,5%), gefolgt von *Streptococcus* (OTU_9) (5%). Alle weiteren identifizierten Gattungen waren zu weniger als 5% in den Proben vertreten. Die nächsten waren *Leptotrichia* (OTU_14) (4%), *Streptococcus* (OTU_7) (3,6%) und *Neisseria* (OTU_18) (3,5%). 25 OTUs waren mindestens zu 1% in allen Proben vertreten (Abbildung 37). Das Verteilungsmuster auf Ebene der Klassen zeigte bei allen Proben ein annähernd ähnliches Verteilungsmuster. Weder offensichtliche Unterschiede zwischen Proben von kariösen Zähnen und gesunden Zähnen waren sichtbar, noch konnte mit Hilfe von der LDA statistisch signifikante Unterschiede berechnet werden. In einer Großzahl der Proben sind die Klassen Bacilli, Betaproteobacteria und Actinobacteria dominierend. Teilweise ist auch die Klasse der TM7 vertreten (Abbildung 38).

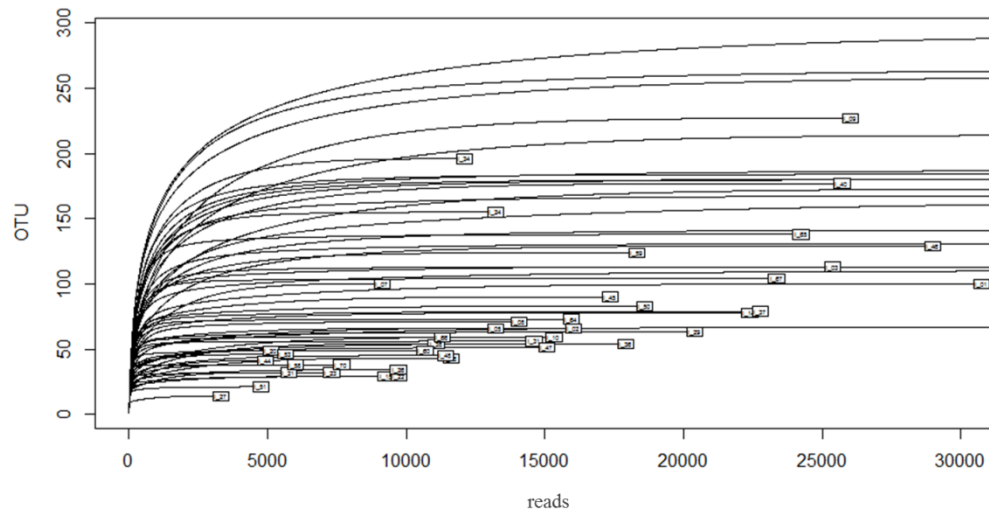


Abbildung 36: Rarefaction curve der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder mit mehr als 4.500 reads pro Probe. 64 Proben zeigten eine Sequenziertiefe von mehr als 4500 reads pro Probe. Die Anzahl der OTUs pro Probe variierte zwischen 15 und knapp 300. In allen Fällen ist eine Sättigung der Kurve erreicht.

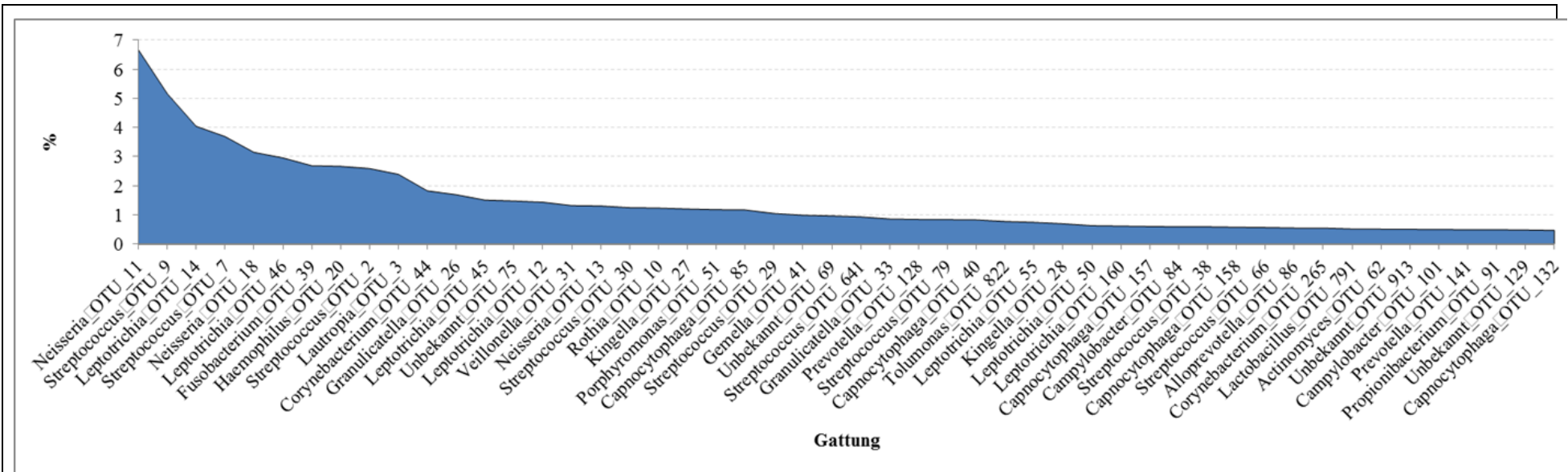


Abbildung 37: Rang-Häufigkeitskurve der identifizierten OTUs in den Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder (Top 50). Die häufigsten Genera waren *Neisseria*, *Streptococcus* und *Leptotrichia*. 25 OTUs waren durchschnittlich häufiger als 1% in den Proben vorhanden.

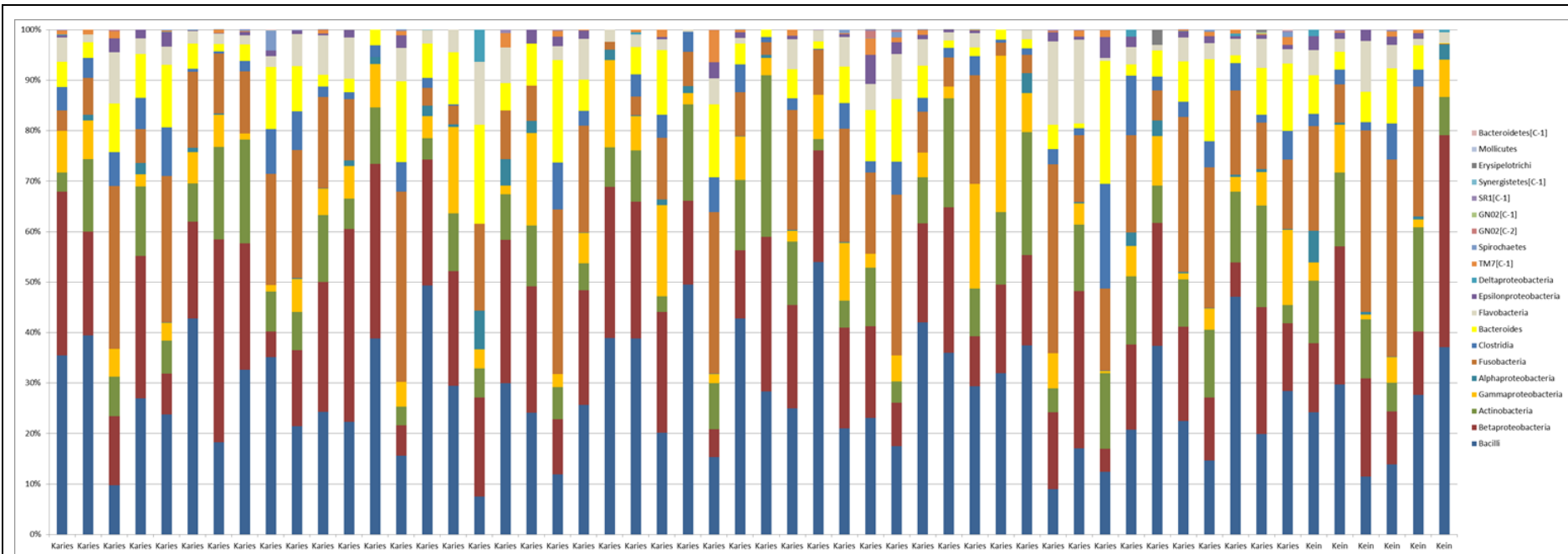


Abbildung 38: Identifizierung der unterschiedlichen Klassen in den Zahnabstrichen des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder. Während die meisten Proben von kariösen Proben entnommen wurden, sind die letzten sechs Proben von gesunden Zähnen. Die identifizierten Klassen sind identisch zwischen den beiden Gruppen. Am häufigsten vorkommend sind Bacilli, Betaproteobacteria und in einigen Proben auch TM7.

3.4.2.1 Hauptkomponentenanalyse

Mit Hilfe der PCoA wurden auch diese Proben auf Ähnlichkeiten untersucht. Ziel war es Gruppen zu identifizieren und diese weiter zu charakterisieren. Es zeigte sich, dass Gruppierungen weder nach Auftrennung der Proben nach Geschlecht (Abbildung 39), noch nach Alter (Abbildung 40) oder nach Kariesstatus (Abbildung 41) sichtbar waren. Die Proben zeigten eine gleichmäßige Verteilung hinsichtlich jeglichen Parameters. Lediglich 26% der gesamten Variabilität konnte durch die gezeigten Komponenten abgedeckt werden.

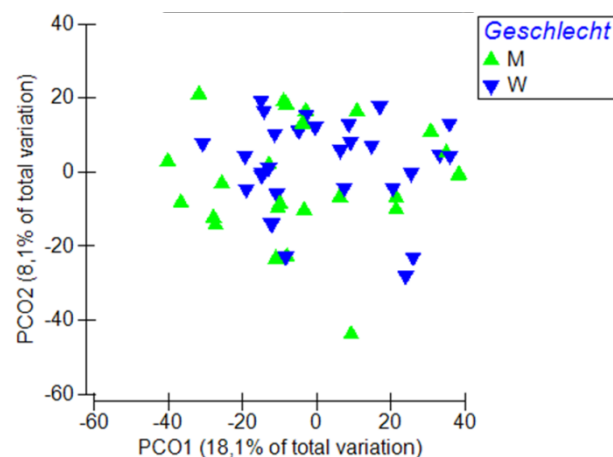


Abbildung 39: PCoA der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder aufgetrennt nach dem Geschlecht der Probanden. Eine Auftrennung nach Geschlecht ist nicht erkennbar. Die Proben sind durchsmischt und nicht geclustert.

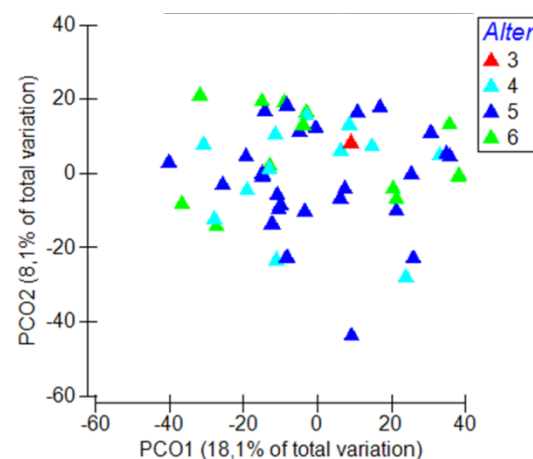


Abbildung 40: PCoA der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder aufgetrennt nach dem Alter der Probanden. Eine Auftrennung hinsichtlich der unterschiedlichen Altersklassen kann bei den Proben nicht vorgenommen werden. Weder eine Clusterung noch ein Trend ist erkennbar.

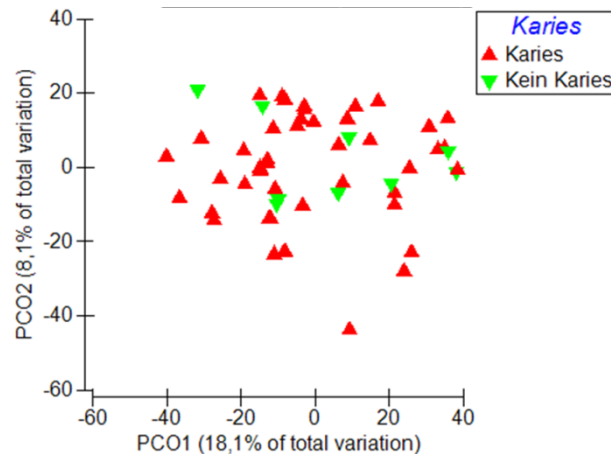


Abbildung 41: PCoA der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder aufgetrennt nach dem Kariesstatus der Probanden. Eine Auftrennung hinsichtlich des Kariesstatus ist nicht möglich. Die Proben von kariösen Zähnen überlappen mit denen von gesunden Zähnen.

3.4.2.2 Diversitätsanalyse

Die Diversität innerhalb der Proben wurde mit dem Shannon-Diversität Index berechnet. Es wurden zunächst zwei Gruppen anhand der Probencharakteristika gebildet. In diesem Falle wurden die Proben von gesunden Probanden (insgesamt acht Probanden) den Proben von Probanden mit Karies (insgesamt 49 Proben) gegenübergestellt. Beide Gruppen zeigten einen Shannon-Diversität von etwa 3,5. Die Proben von Personen mit Karies zeigt eine größere Abweichung vom Median, als dies bei den Proben von gesunden Personen der Fall ist (Abbildung 41).

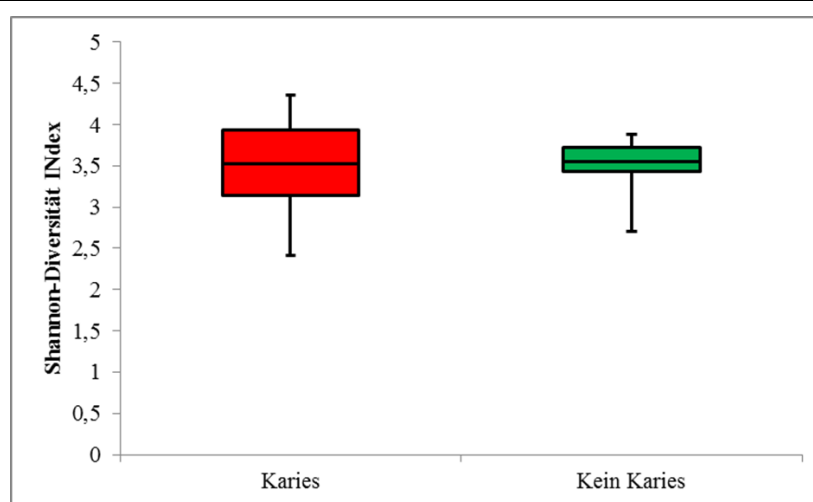


Abbildung 42: Shannon-Diversität der Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder, gruppiert nach Kariesstatus. Die Diversität der Proben von kariösen Zähnen und der Proben von gesunden Zähnen ist nahezu identisch. Beide sind etwa bei einem Wert von 3,5. Ein Unterschied ist nicht erkennbar.

Dieses Projekt zeigt eine Population indonesischer Kinder mit einem großen Anteil an kariösen Zähnen. So waren eine Großzahl der beprobten Zähne bereits an Karies erkrankt. Die häufigsten gefundenen Gattungen waren neben *Neisseria*, *Streptococcus*

und *Leptotrichia*. Auf Klassenebene wurden die Proben dominiert von Bacilli, Betaproteobacteria, Actinobacteria und Bacteroides. Unterschiede in der Zusammensetzung bei Probanden mit und ohne Karies waren nicht erkennbar. Ebenso war die Diversität bei allen Proben signifikant verschieden und ein Unterschied zwischen den Abstrichen von kariösen und gesunden Zähnen konnte nicht gefunden werden.

3.5 Zahnmikrobiom von gesunden (KraKi-Studie) und kariösen Zähnen (Zahnmikrobiom indonesischer Kinder)

In diesem Abschnitt werden die Proben der Probanden aus der KraKi-Studie und die Proben des Indonesien-Projektes miteinander verglichen. Ziel war es, Ähnlichkeiten und Unterschiede im Zahnmikrobiom von Kindern aus Deutschland und Indonesien zu identifizieren.

Bei der Principle Coordinate Analyse zeigte sich auf den ersten Blick eine mögliche Trennung nach den Projekten (Abbildung 42A). Beide Studien teilten insgesamt 579 OTUs. 255 OTUs wurden ausschließlich bei den Proben des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder identifiziert, wohingegen 118 OTUs ausschließlich bei der KraKi-Studie gefunden wurden (Abbildung 42B). Statistisch (LDA) zeigte sich, dass bei den Proben von gesunden Zähnen im Vergleich zu Proben von kariösen Zähnen vorwiegend *Porphyromonas_OTU_927*, *Burkholderia_OTU_42* und *Gardnerella_OTU_93* dominant waren. Demgegenüber zeigten sich *Abiotrophia_OTU_913*, *Neisseria_OTU_134* und *Granulicatella_OTU_381* als dominant bei Proben von kariösen Zähnen (Abbildung 43C). Bei Betrachtung derselben Proben hinsichtlich des Kariesstatus zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Proben, wie bei der Betrachtung hinsichtlich der unterschiedlichen Projekte (Abbildung 44). In beiden Fällen war nur ein geringer Anteil der gesamten Varianz der Proben durch die gezeigten Komponenten abgedeckt (23,1 % der gesamten Varianz). Bei der Shannon-Diversität der Proben hinsichtlich des Projektes konnte ein Median von etwa 3 bei der KraKi-Studie und 3,5 bei dem Indonesien-Projekt berechnet werden. Ein zweiseitiger T-Test zeigte hier jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 45). Ein identisches Bild zeigte sich hinsichtlich des Kariesstatus: Median Karies: 3.5/Median Gesund 3 (Abbildung 46). Ein zweiseitiger T-Test konnte hier ebenfalls keinen signifikanten Unterschied darlegen.

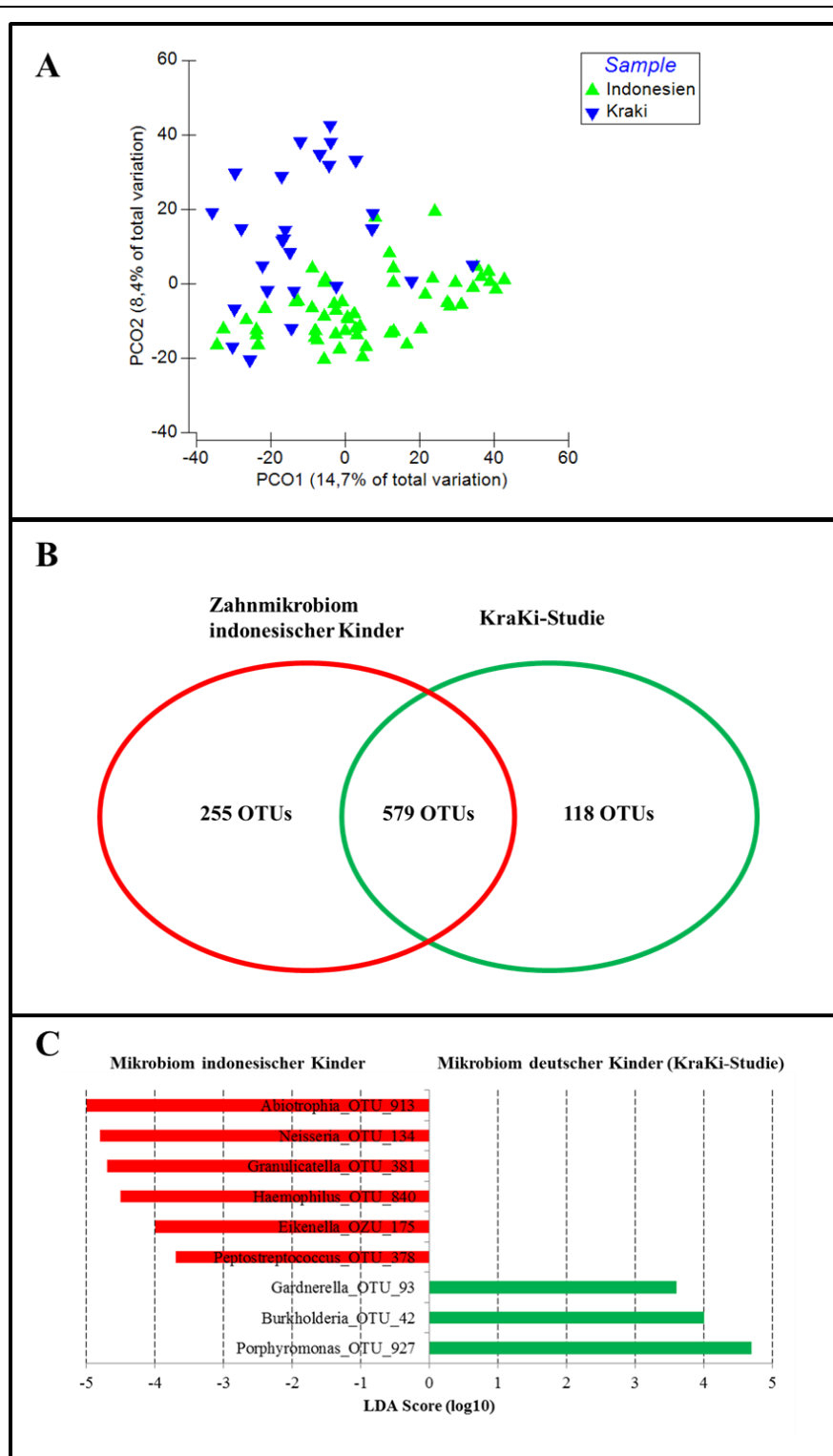


Abbildung 43: Vergleich der KraKi-Studie und des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder mit einer PCoA. A zeigt eine PCoA vbeider Probensätze. Eine eindeutige Trennung der Projekte ist nicht erkennbar. Zwar ist eine Tendenz sichtbar, dennoch sind einige Proben der beiden Projekte vermischt. **B** zeigt ein Venn-Diagramm mit der Anzahl der OTUs, die beide Studien gemeinsam haben. **C** zeigt eine LDA beider Probensätze mit entsprechenden Biomarkern für Proben von kariösen Zähnen und Proben von gesunden Zähnen.

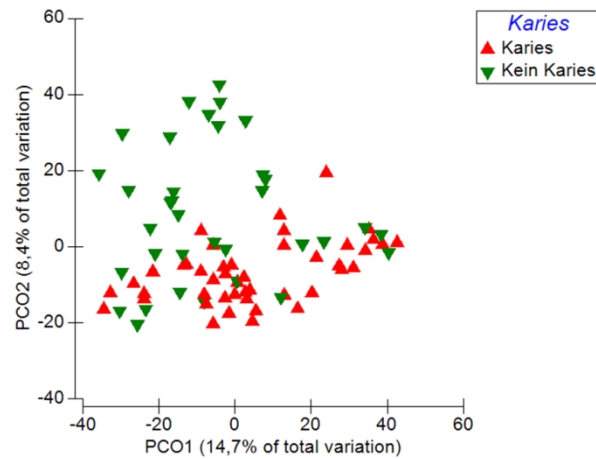


Abbildung 44: Vergleich des Kariesstatus der KraKi-Studie und des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder mit einer PCoA. Proben von kariösen und nicht-kariösen Zähnen überlappen und führen zu einer nicht eindeutigen Trennung selbiger.

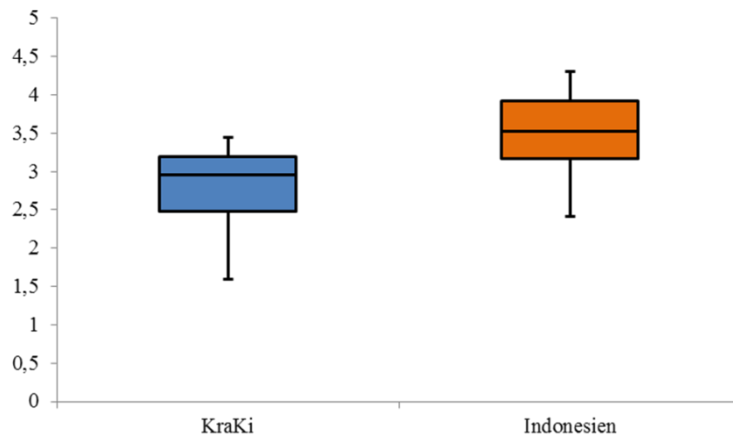


Abbildung 45: Shannon-Diversität der KraKi-Studie im Vergleich mit dem Zahnmikrobiom indonesischer Kinder. Die Diversität der Proben aus der KraKi-Studie sind mit etwa 3,0 geringer als die Diversität der Proben aus Indonesien mit einem Wert von 3,5. Eine statistische Signifikanz ist nicht gegeben.

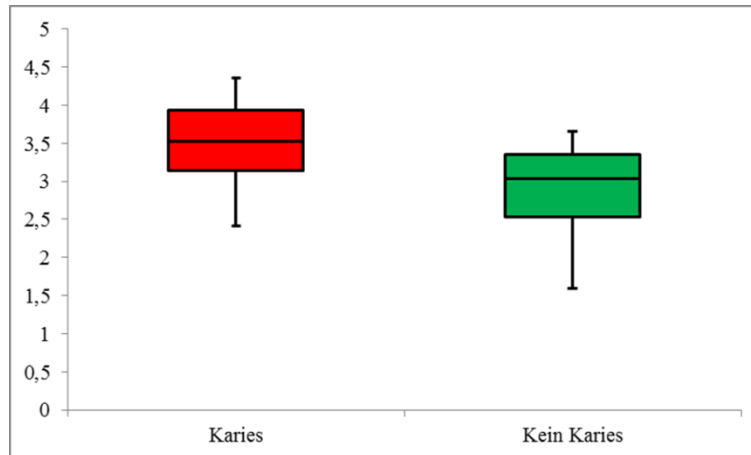


Abbildung 46: Shannon-Diversität der KraKi-Studie und des Zahnmikrobioms indonesischer Kinder unter Berücksichtigung des Kariesstatus der Probanden. Die Proben unterscheiden sich nicht statistisch signifikant in der Diversität bei einem Vergleich zwischen Proben von kariösen Zähnen und gesunden Zähnen. Kariöse Zähne haben eine etwas größere Diversität (3,5), als kariesfreie Zähne (3,0) im Hinblick auf die gefundenen Mikroorganismen.

Die Proben aus Indonesien und aus der Braunschweiger KraKi-Studie unterschieden sich auf Gattungsebene hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung. Entsprechende Biomarker konnten identifiziert werden. Unterschiede hinsichtlich der Diversität zwischen den Projekten konnten nicht gefunden werden. Gleichmaßen wurde auch kein Unterschied der Diversität bei den Proben von Kindern mit Karies und von Kindern ohne Karies gefunden.

3.6 Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies

Dies Studie verfolgte das Ziel die mikrobielle Zusammensetzung bei den unterschiedlichen Typen der frühkindlichen Karies (Typ I bis Typ III) (siehe 2.3.3) zu identifizieren und zu klassifizieren.

3.6.1 Probanden

Die Probanden teilten sich gleichmäßig auf beide Geschlechter auf (50% Jungen/50% Mädchen). Die Altersverteilung war nicht derart homogen wie die Geschlechteraufteilung. So waren bei den Jungen alle Altersklassen von zwei bis sechs Jahren abgedeckt, wohingegen bei den Mädchen die Altersstufen fünf und sechs komplett fehlten. Etwa 17% der Jungen waren zwei Jahre alt, wobei hier drei Prozent (ein Proband) Typ III ECC aufwies. Ansonsten zeigte sich eine Dominanz der Typ II ECC (37% Jungen und 33% Mädchen) (Abbildung 47).

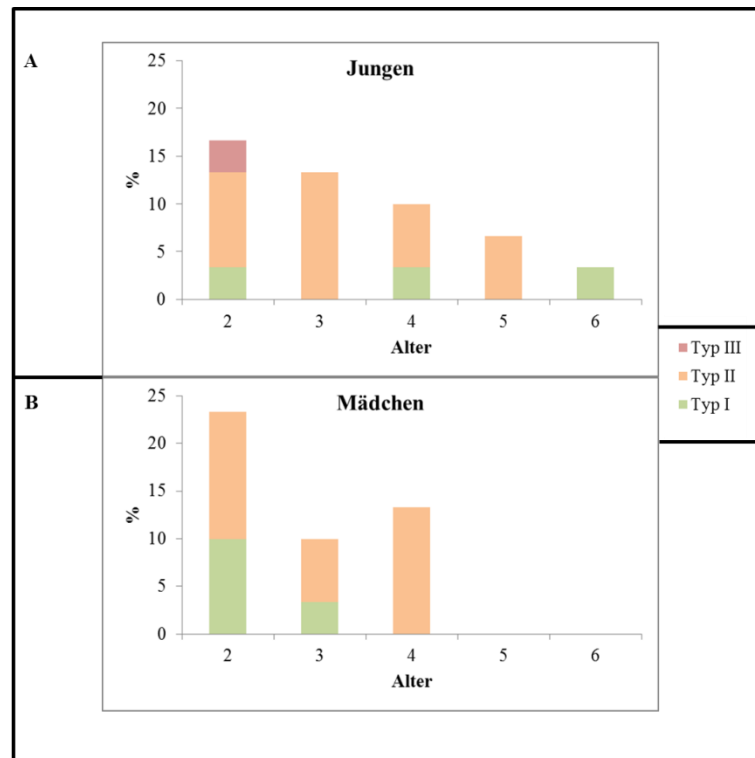


Abbildung 47: Altersverteilung und Kariesstatus der Probanden aufgetrennt nach Geschlecht. Bei den Jungen waren alle Altersgruppen vertreten, wohingegen die Mädchen zwischen zwei und sechs Jahren alt waren. Der am häufigsten vorkommende Kariestyp war Typ II ECC. Bei den Jungen wies ein Proband (2,5%) Typ III ECC auf.

3.6.2 Mikrobiomdaten

3.6.2.1 Rarefaction curve

Nach Ausschluss aller Datensätze mit weniger als 4.500 reads pro Probe blieben 125 Datensätze übrig. Diese Proben hatten zwischen 50 und 220 OTUs pro Probe, wobei der Durchschnitt bei 120 OTUs pro Probe lag (Abbildung 48).

Um einen Überblick über die Schneidezähne zu bekommen wurden zunächst beide Proben, die zu den oberen Schneidezähnen eines Probanden gehörten bioinformatisch zusammengefasst. Zudem wurden die Proben von gesunden Probanden gepoolt und sequenziert und für die weitere Analyse mit einbezogen (siehe 2.4.3). Anschließend wurde auch hier eine rarefaction curve erstellt. Insgesamt wurden 23 Proben erhalten. Alle Proben zeigten eine ausreichende Sequenziertiefe. Die Anzahl der OTUs pro Probe variierte zwischen 55 und 155 OTUs (Abbildung 49).

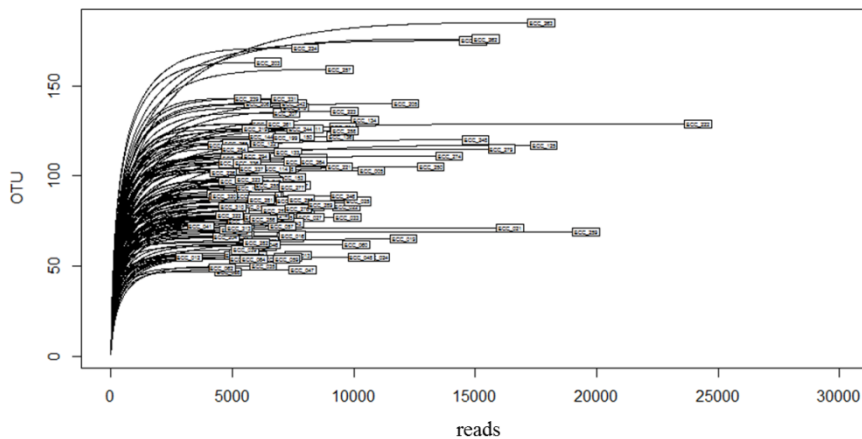


Abbildung 48: Rarefaction curve aller Proben der Studie. 125 Proben von 300 Proben von Probanden mit ECC wiesen mindestens 4500 reads pro Probe auf. Alle Proben zeigten sich gesättigt. Die OTU-Anzahl variierte zwischen 50 OTUs und 220 OTUs pro Probe.

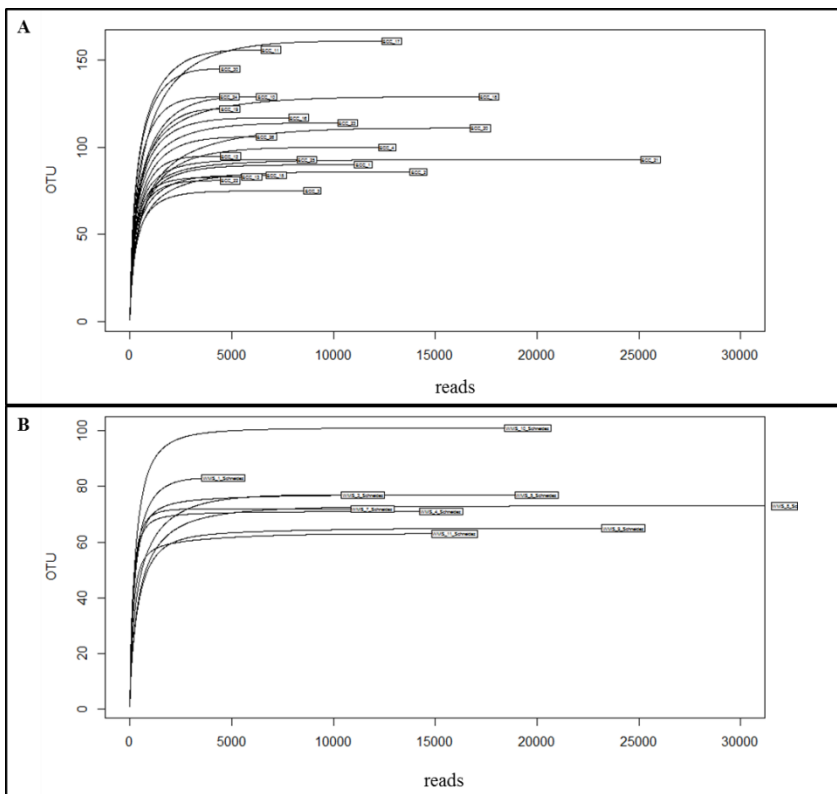


Abbildung 49: Rarefaction curve der Proben von den Oberkiefer Frontschneidezähnen der Studie. **A** zeigt alle Proben von kariösen Zähnen. **B** zeigt die Proben der gesunden Kontrollgruppe. Von 30 Proben mit ECC blieben 21 Proben mit mehr als 4500 reads pro Probe erhalten. Bei den Proben von gesunden Kindern hatten neun von zehn Proben mehr als 4500 reads pro Probe. Alle Proben zeigten sich gesättigt. Bei den ECC-Proben variierte die OTU-Anzahl zwischen 65 und 160 OTUs pro Probe. Bei den Proben von gesunden Kindern variierte die OTU-Anzahl zwischen 60 und 100 OTUs pro Probe.

3.6.2.2 Zahnmikrobiom von Probanden mit und ohne Karies

Die häufigsten Mikroorganismen, die in diesem Probensatz gefunden wurden, waren der Gattung *Streptococcus* zuzuordnen. Das am häufigsten gefundene OTU bei den Proben von kariösen Zähnen war durchschnittlich zu mehr als 25% in allen Proben vertreten (Abbildung 50A). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Proben von den kariösen Schneidezähnen der Kindern (Abbildung 50B) und den Schneidezähnen von gesunden Kindern (Abbildung 50C). Hier war dasselbe OTU gar zu mehr als 35% durchschnittlich in allen Proben vertreten. Auffällig war auch, dass bei den Proben von gesunden Zähnen lediglich 9 OTUs zu mehr als 1% vertreten waren, wohingegen dies bei den Proben von kariösen Zähnen immerhin 13 OTUs zu 1% oder mehr im Durchschnitt in allen Proben vorgekommen sind. Auf Artebene waren die zwei häufigsten OTUs bei den Proben von kariösen Zähnen *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus*. Ebendies waren auch die beiden häufigsten Arten bei den Proben von gesunden Zähnen.

Auf Ebene der Klassen zeigten sich keine Unterschiede im Hinblick auf die verschiedenen Typen der ECC. Mit zwei Ausnahmen waren in nahezu allen Fällen die Klasse der Bacilli mit annähernd 50% in allen Proben dominierend. Als zweithäufigste Klasse waren die Actinobacteria vertreten. Die Proben von gesunden Probanden, sowie die von Probanden mit einer Karies zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster. Bei den Proben von gesunden Probanden waren die Gammaproteobacteria häufiger vertreten im Vergleich zu den Proben von kariösen Probanden (Abbildung 51). Ein einseitiger T-Test zeigte, dass Gammaproteobacteria häufiger in Proben von gesunden Probanden gefunden werden können, als in Proben von Personen mit Karies ($p=0,001$).

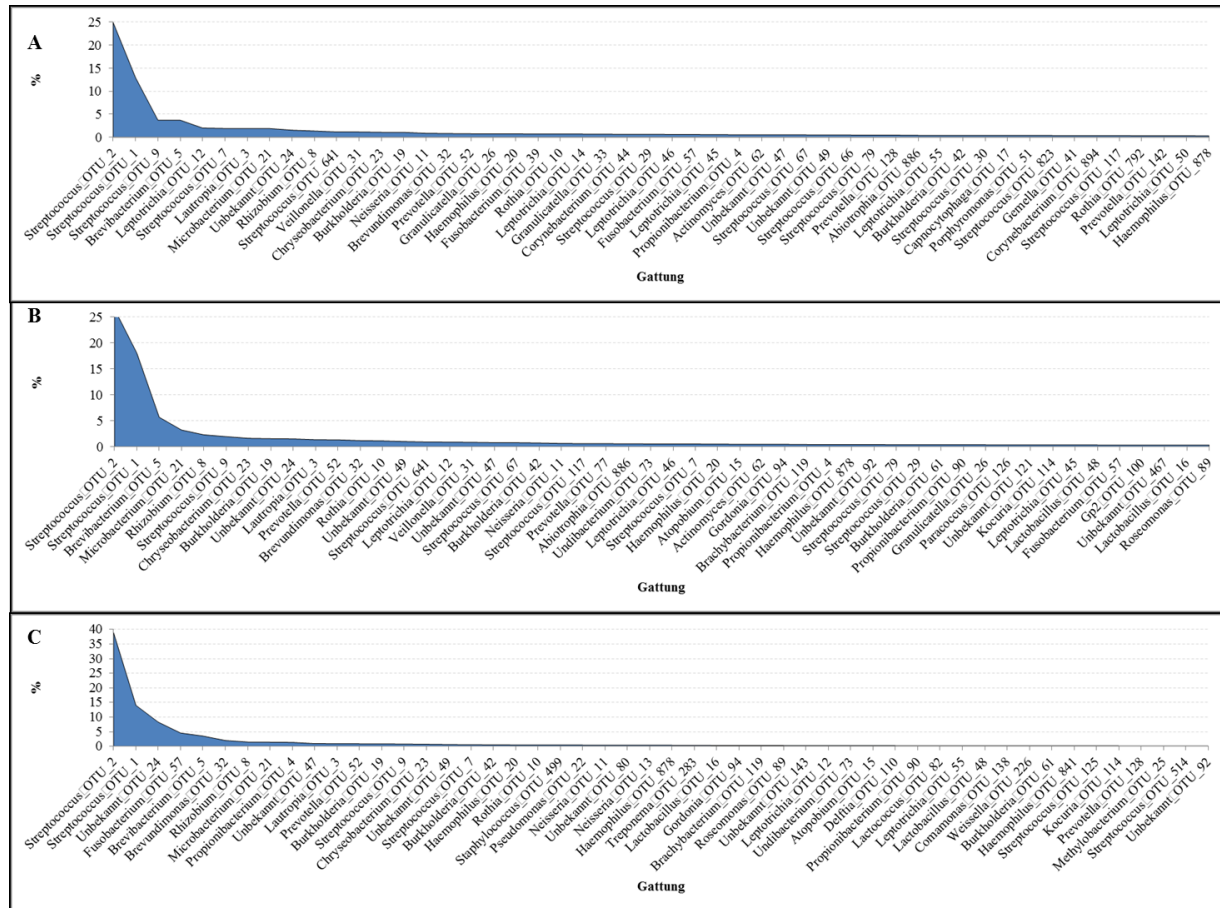


Abbildung 50: Rang-Häufigkeit Verteilung der identifizierten OTUs auf Gattungsebene. **A** zeigt die häufigsten 50 Gattungen in allen Proben dieser Studie. **B** zeigt die 50 häufigsten Gattungen in den Proben von Kindern mit Karies. **C** zeigt die 50 häufigsten Gattungen bei den Proben von Kindern mit gesunden Zähnen. Die Gattung *Streptococcus* ist in allen Fällen dominierend. Insbesondere bei den Proben von gesunden Kindern fällt auf, dass mehr als 50% der OTUs dieser Gattung zugeordnet werden können. Aber auch bei den Proben von kariösen Kindern ist die Gattung *Streptococcus* dominant. Insgesamt zeigt sich eine ähnliche Verteilung der Gattungen bei beiden Proben, mit Ausnahme der ersten fünf identifizierten Gattungen.

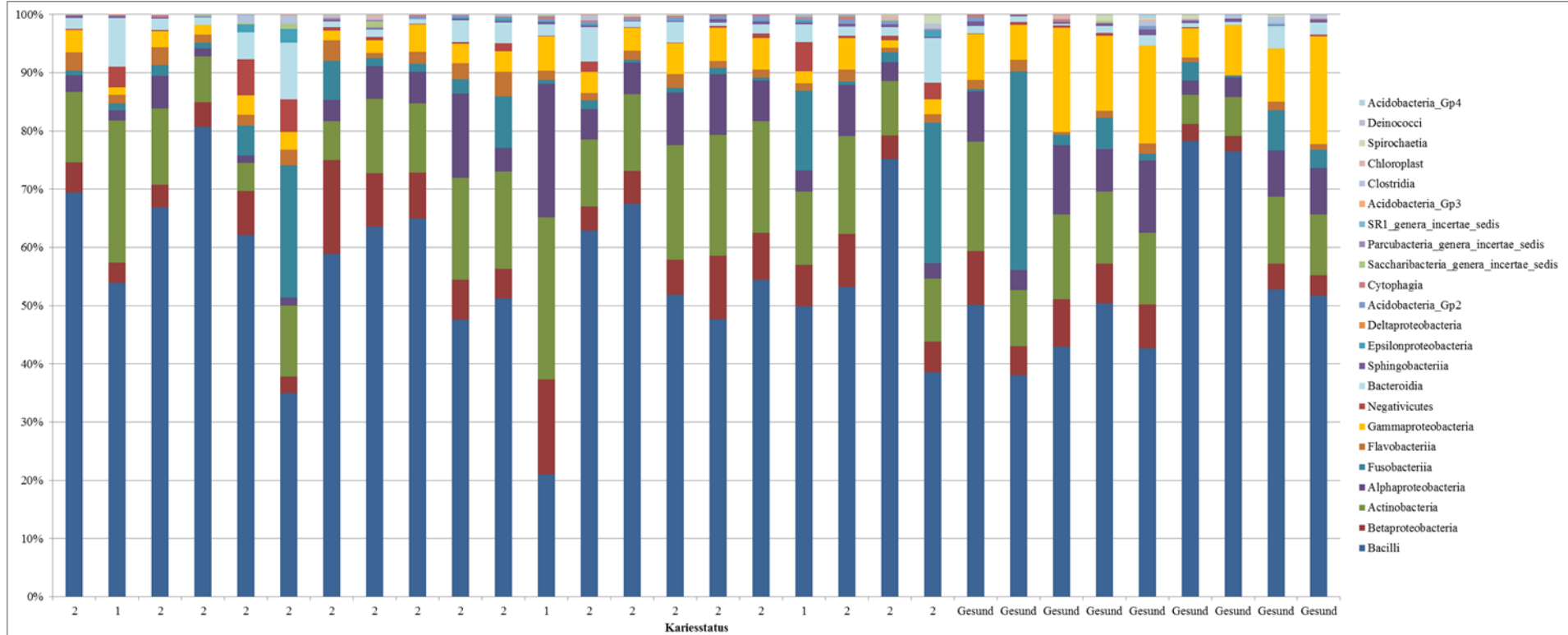
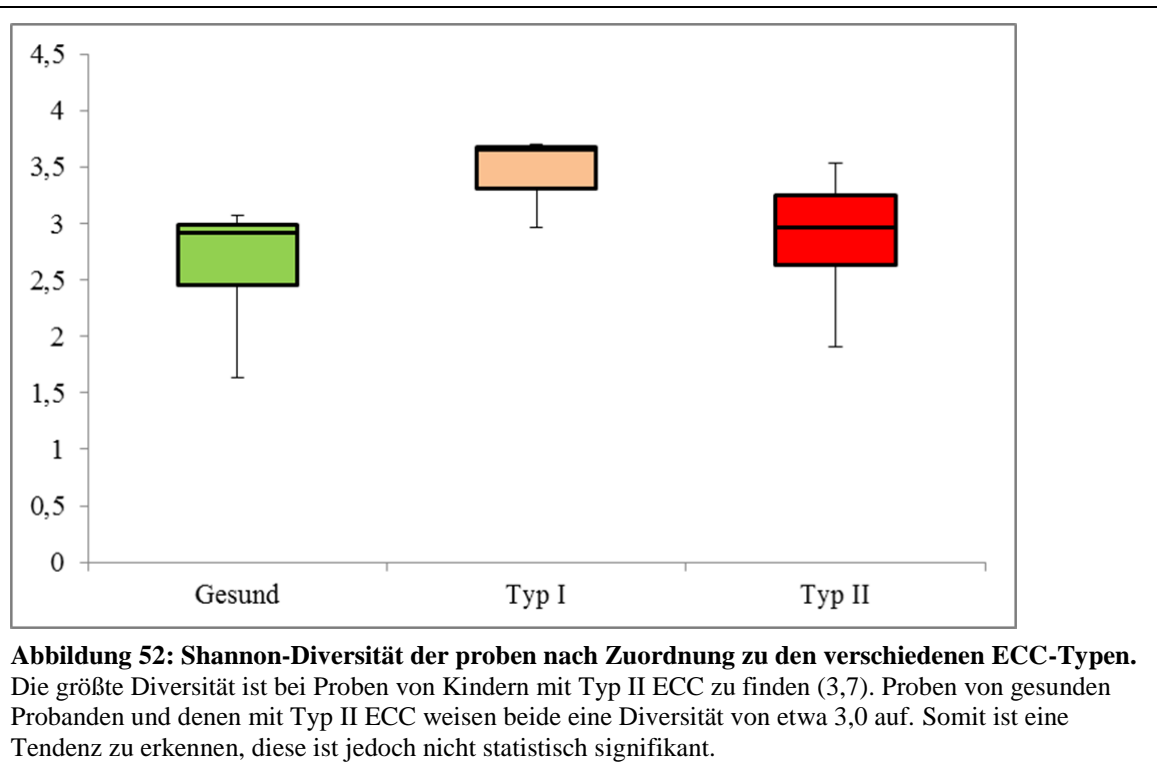


Abbildung 51: Identifizierung der Klassen sortiert nach Kariestyp der Proben. Zwischen Typ I und Typ II ECC ist kein Unterschied sichtbar. Bei den gesunden Proben sind vermehrt Bakterien der Klasse Gammaproteobacteria vorzufinden. Die dominierenden Klassen sind Bacilli, Actinobacteria und mit Abstrichen sowohl Betaproteobacteria als auch Alphaproteobacteria. Auch Bacteroida kann in einigen Proben vermehrt vorgefunden werden.

3.6.2.3 Diversität der Proben

Sowohl Typ I als auch Typ II zeigten eine mittlere Diversität zwischen 2,5 und 3,0. Signifikante Unterschiede konnten nicht berechnet werden. Auffällig ist jedoch, dass bei Typ I die Streuung deutlich größer ist, als bei Typ II. So wurden als geringster Wert etwa 1,5 festgestellt und als Maximum ein Wert von nahezu 5. Bei Typ II reichte die Spanne von 2 bis 3,6 (Abbildung 52).



3.6.2.4 Hauptkomponentenanalyse

Zunächst wurden alle Proben der Studie auf ihre Ähnlichkeit und eine Gruppierung hin untersucht. Hierbei zeigte sich in mehreren Fällen eine Gruppierung nach Proband. Besonders deutlich zeigte sich dieses bei den Probanden 4, 5, 11, 19 und 26. In einigen Fällen war allerdings auch das Gegenteil der Fall, so etwa bei den Probanden 1, 21 und 22. Alle anderen Proben wiesen Mischformen auf, also teilweise gruppierte Proben vermischt mit Proben, die nicht direkt zu der Gruppe zugeordnet werden konnten (Abbildung 53). Weitere Gruppierungen, etwa unter Berücksichtigung des Alters oder des ECC-Typus, zeigten keine verwertbaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

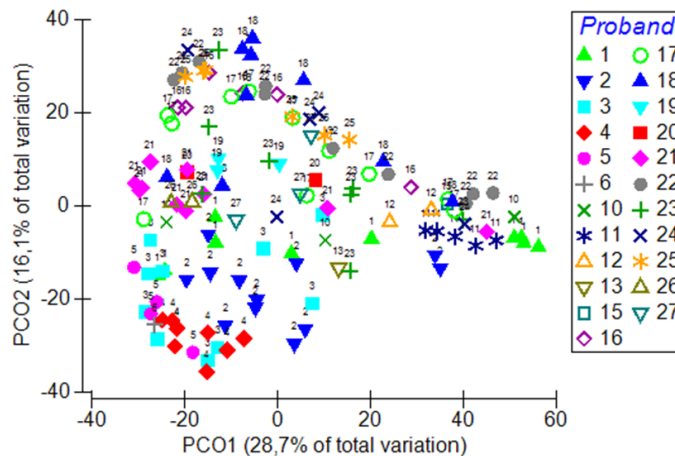


Abbildung 53: PCoA aller Proben der Studie zu dem Mikrobiom bei frühkindlicher Karies aus München. Mitunter konnten einzelne Gruppen visualisiert werden. So gruppieren sich teilweise die Proben von einzelnen Probanden miteinander. Dies ist der Fall bei den Probanden 4, 5, 11, 19 und 26. Allerdings zeigte sich bei manchen Probanden auch das komplette Gegenteil, so etwa bei den Probanden 1, 21 und 22.

Anschließend wurden die bioinformatisch zusammengeführten Proben und erneut sequenzierten Proben der vier Frontschneidezähne des Oberkiefers betrachtet. Hier wurde eine Betrachtung der Proben unter Berücksichtigung des ECC-Typus ausgewählt. Es zeigte sich keine Gruppierung nach ECC-Typ (Abbildung 54A). Eine Auftrennung hinsichtlich des Kariesstatus war nicht möglich. Jedoch zeigten sich zwei Cluster, die nachfolgend als Gruppe 1 und Gruppe 2 bezeichnet wurden. Gruppe 1 wies ausschließlich Proben auf, die von Zähnen mit ECC entnommen wurden. Gruppe 2 beinhaltete sowohl Proben von Zähnen mit ECC als auch von Proben gesunder Zähne. Eine LDA konnte diese Gruppen auftrennen und entsprechende Gattungen als Biomarker identifizieren. Während Gruppe 2 zwei Gattungen vorwies, die charakteristisch waren für dieses cluster, konnten bei Gruppe 1 sieben Gattungen als Biomarker gefunden werden. Gruppe 2 wurde charakterisiert durch die Gattungen *Brevibacterium* und *Haemophilus*. Gruppe 1 zeigte mehrere Gattungen als charakteristisch für diesen cluster: *Actinomyces*, *Tannerella*, *Neisseria*, *Bergeyella*, *Peptostreptococcaceae*, *Megasphaera* und *Eikenella*. Sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 2 zeigten die genannten Gattungen deutlich erhöhte LDA Scores, was auf eine eindeutige Zuordnung als Biomarker hinwies (Abbildung 54B).

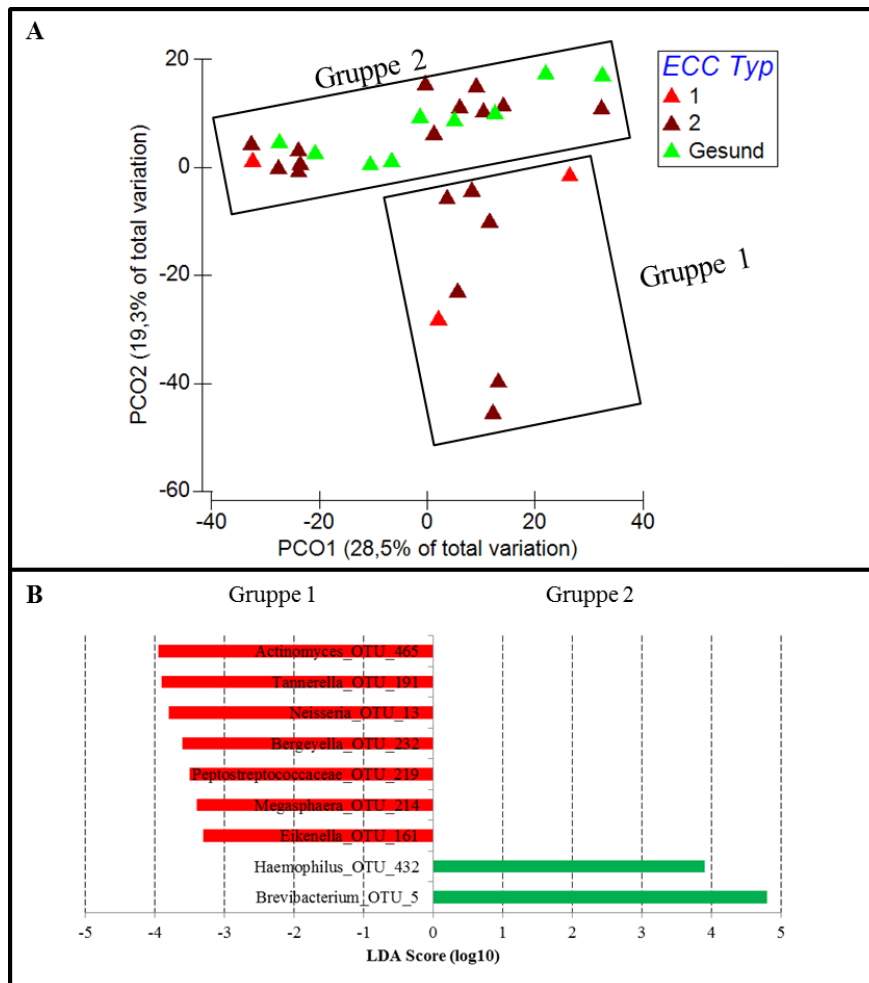


Abbildung 54: PCoA der Proben von den Frontschneidezähnen des Oberkiefers (A) und Charakteristika der Gruppen (B). Die Proben der Schneidezähne konnten keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich einer Trennung unter Berücksichtigung des Kariesstatus vorweisen. Dennoch konnten zwei Gruppen identifiziert werden (A). Diese Gruppen unterschieden sich in der Zusammensetzung auf der Gattungsebene (B). Die Unterschiede wurden mit einer LDA berechnet.

Zusammenfassend kann über diese Studie gesagt werden, dass eine Auftrennung aller Proben von allen Zähnen des Mundraums nach Proband in einigen Fällen möglich ist. Generell konnte diese Aussage jedoch nicht gestützt werden durch die hier vorhandenen Daten. Eine Auftrennung der Proben hinsichtlich des Kariesstatus war nicht möglich. Bei der Betrachtung der Schneidezähne konnte ebenfalls keine klare Trennung zwischen Proben von kariösen Zähnen und von gesunden Zähnen gefunden werden. Es zeigten sich allerdings zwei Gruppen, die hinsichtlich der Zusammensetzung Unterschiede aufwiesen. Diese Unterschiede wurden auf der Gattungsebene analysiert. Die Gruppe, die Proben von gesunden Zähnen enthielt, zeigte eine Häufung von *Brevibacterium*, wohingegen die Gruppe mit Proben von ausschließlich kariösen Zähnen durch das Vorhandensein von *Actinomyces*, *Tannerella* und weiteren charakterisiert werden konnte.

3.7 Vergleich der Projekte

Die Proben der KraKi-Studie und des Projektes in Indonesien wurden bereits miteinander verglichen (siehe 3.5). In diesen mikrobiologischen Vergleich sind nun noch die Proben der Studie aus München mit eingeflossen und die Analysen fokussierten sich vorwiegend auf speziell ausgewählten Phyla, Gattungen und Arten. Bei Betrachtung der Rang-Häufigkeit Verteilung dieser drei Projekte auf Gattungsebene zeigte sich eine Dominanz von *Streptococcus* vorwiegend in den Proben aus München. Die Proben des Projektes aus Indonesien, sowie die Proben der KraKi-Studie zeigten keine derartige Verteilung. Es waren auch hier Mikroorganismen der Gattung *Streptococcus*, die den größten Anteil der gefundenen OTUs beschrieben, jedoch andere als in den Proben aus München. Im weiteren Verlauf zeigte sich eine diffuse Verteilung der Gattungen verglichen mit dem Gesamtwert aller Proben (Abbildung 55).

Es wurden vier Phyla in allen klinischen Proben (100%) gefunden: Bacteroides (KraKi 52%, Indonesien 81%), Firmicutes (85%, 95%), Proteobacteria (80%, 92%) und Actinobacteria (68%, 88%). Fusobacteria (Indonesien 88%, KraKi 52%, München 30%), TM7 (41%, 12%, 26%) und SR1 (24%, 16%, 8%) waren allesamt häufiger in den Proben des Indonesien-Projektes zu finden. (Abbildung 55).

Die gleiche Betrachtung wurde ebenfalls auf Ebene ausgewählter Gattungen durchgeführt. Während die Gattungen *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Bergeyella*, *Lautropia* und *Prevotella* in allen Proben (100%) aus München gefunden werden konnten, waren *Neisseria* (100%), *Streptococcus* (97%) und *Haemophilus* (95%) die häufigsten Gattungen in den Proben aus Indonesien. Die gleichen Gattungen in anderer Reihenfolge der häufigsten dieser ausgewählten Gattungen war auch für die Proben der KraKi-Studie zu beobachten: *Streptococcus* (83%), *Neisseria* (80%), und *Haemophilus* (80%) (Abbildung 56). Die häufigsten identifizierten Arten der Proben aus München wurden nun als Referenzwert für einen Vergleich genommen. Fünf Arten (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *H. parainfluenzae*, *Prevotella bivia*, *Moraxella osloensis*) wurden in allen Proben gefunden. Die Unterschiede waren hier teilweise deutlich. *Kingella oralis*, *Neisseria elongata*, *Kingella denitrificans*, *S. gordonii*, *Capnocytophaga sputigena*, *Leptotrichia shahii* und *Cornyebacterium matruchotii* konnten im Vergleich zu den Proben aus München und denen der KraKi-Studie vermehrt in den Proben aus Indonesien gefunden werden. Die Proben der KraKi-Studie wiesen eine größere Häufigkeit bei *Actinomyces oris* und *Pseudomonas fluorescens* auf (Abbildung 57).

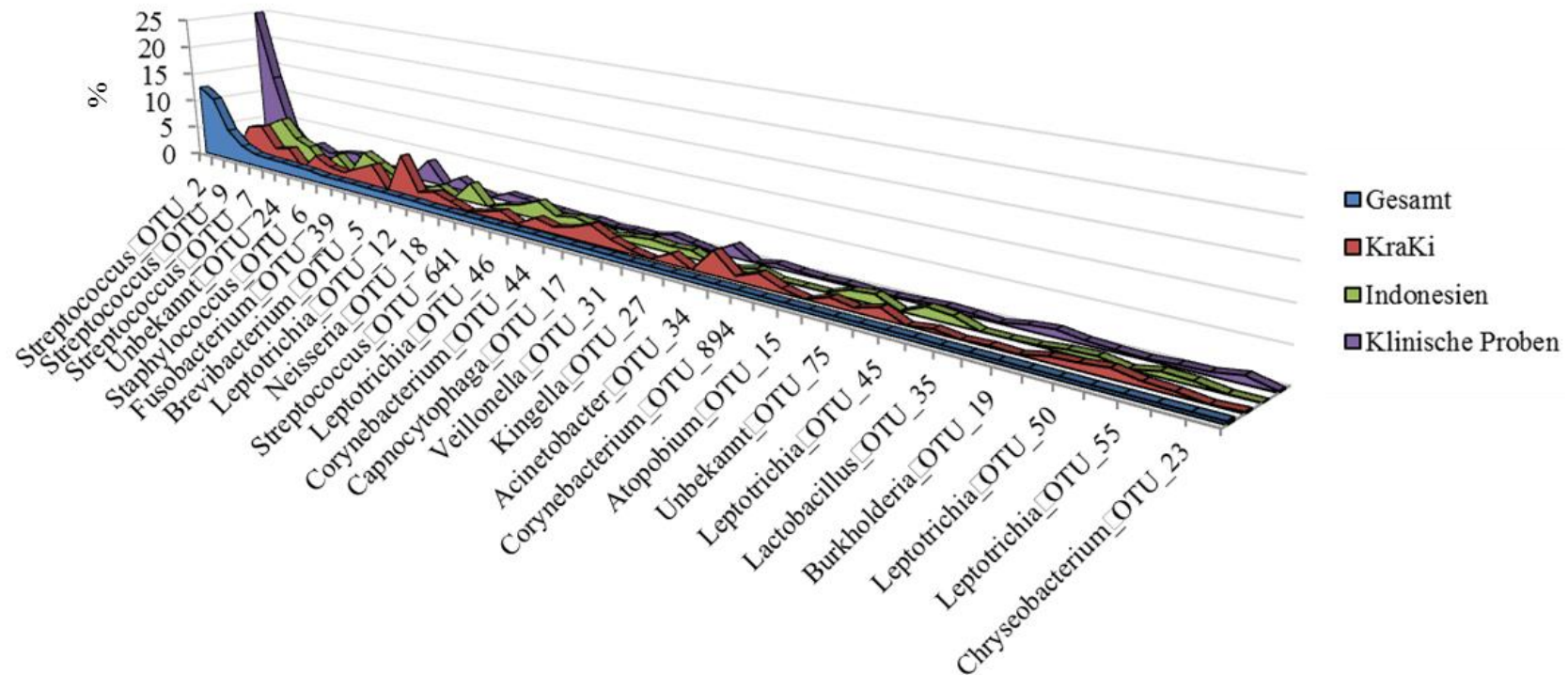


Abbildung 55: Rang-Häufigkeit Verteilung der identifizierten OTUs. Die Häufigkeit der OTUs wurde sortiert nach dem durchschnittlichen Auftreten in dem gesamten Probensatz. Die einzelnen Projekte zeigen deutliche Unterschiede im Hinblick auf die Zusammensetzung der verschiedenen Gattungen, die den einzelnen OTUs zugeordnet werden konnten. In allen Proben ist die Gattungen *Streptococcus* in einer Vielzahl vertreten. Auffällig ist jedoch der hohe Anteil des häufigsten OTUs in den Proben aus München. Die Proben der KraKi-Studie zeigten eine diffuse Verteilung der der OTUs verglichen mit dem gesamten Vorkommen in allen Proben. Aber auch bei den Proben aus Indonesien war eine größere Heterogenität erkennbar im Vergleich mit den OTUs aller Proben.

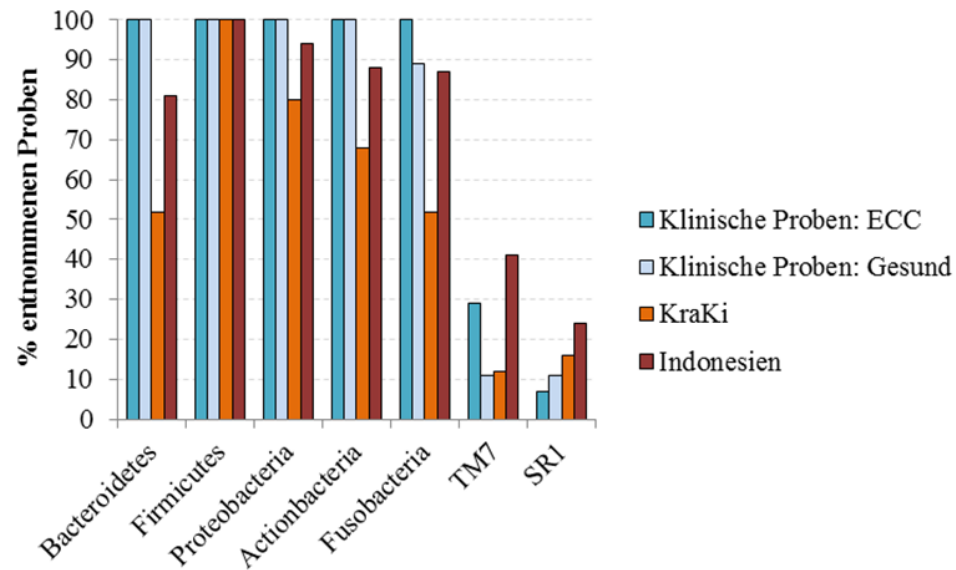
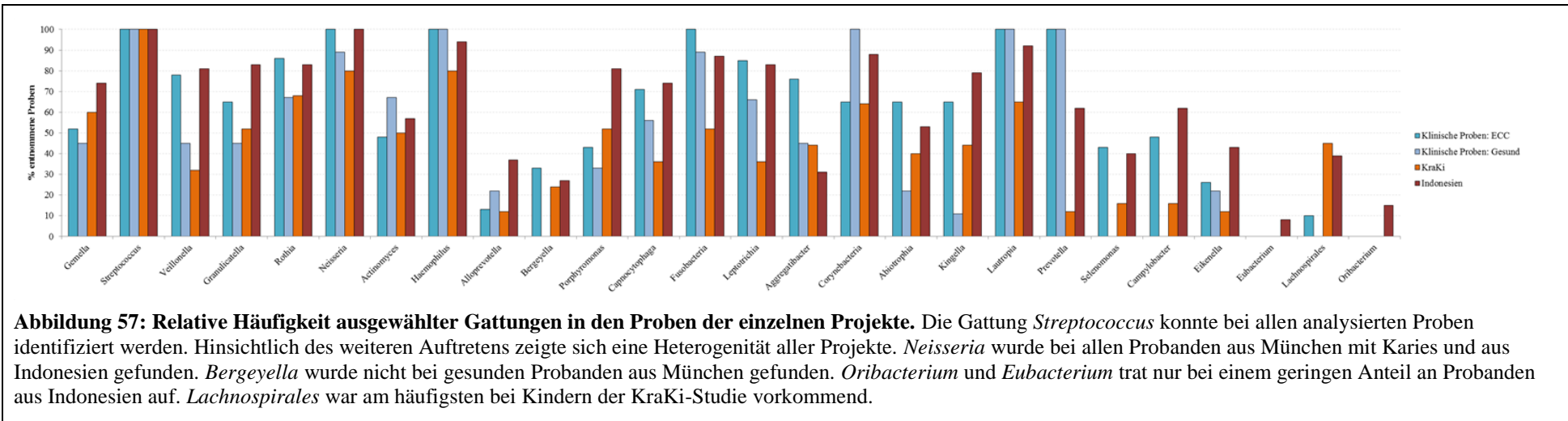


Abbildung 56: Relative Häufigkeit ausgewählter Phyla in den Proben der einzelnen Projekte. Die hier untersuchten Phyla wurden mit Ausnahme von TM7 und SR1 in allen Kindern mit Karies aus der in München durchgeführten Studie identifiziert. TM7 konnte bei etwa 40% der Kinder aus Indonesien gefunden werden, was einen Höchstwert darstellte. Firmicutes konnten in allen analysierten Proben bei allen Projekten identifiziert werden.



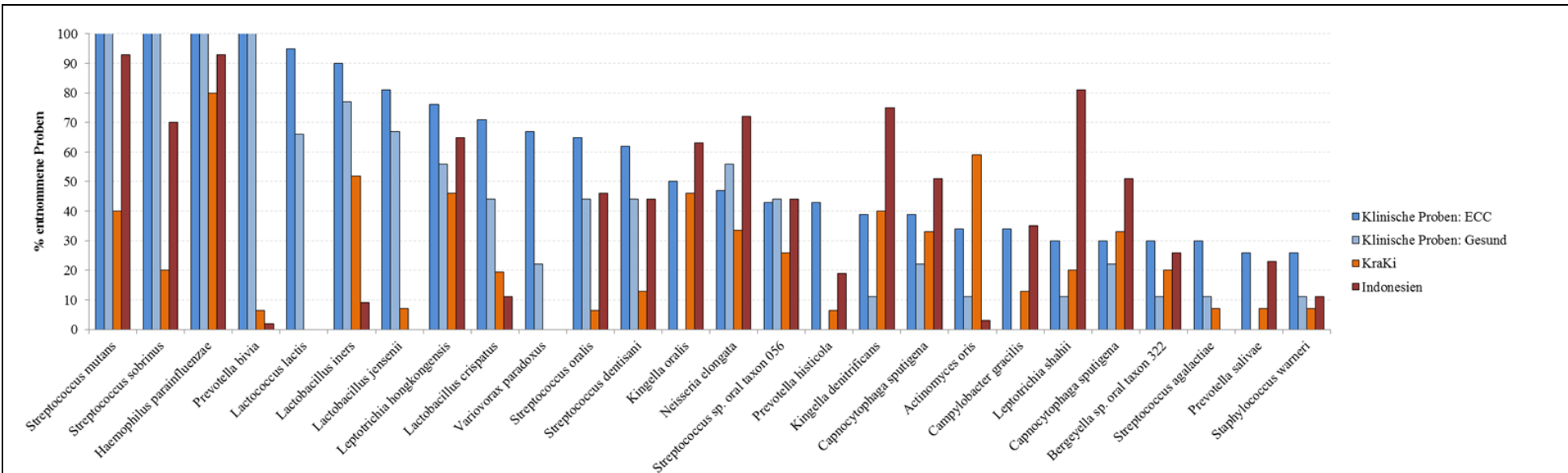


Abbildung 58: Relative Häufigkeit der häufigsten in den Proben aus München gefundener Arten im Vergleich der einzelnen Projekte. *Streptococcus mutans* war in allen Proben aus München enthalten. In weniger als der Hälfte der Proben der KraKi-Studie und in mehr als 90% des Indonesien-Projektes wurde diese Art gefunden. *Prevotella bivia* war nur in wenigen Proben aus Braunschweig und Indonesien vorhanden, jedoch in allen Proben aus München. Auffällig war, dass die Arten, die in nur wenigen Probanden aus München identifiziert werden konnten, in ebenso vielen oder mehr Probanden aus Indonesien und Braunschweig identifiziert werden konnten.

So waren die klinischen Proben aus München von gesunden und kariösen Zähnen ähnlich zueinander. Die Proben aus Braunschweig (KraKi-Studie) und aus Indonesien (Zahnmikrobiom indonesischer Kinder) zeigten unterschiedliche Zusammensetzungen als die klinischen Proben. Die Abundanzen der in den Proben identifizierten Gattungen zeigten teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Projekten. Dies zeigte sich sowohl bei der Rang-Häufigkeit, als auch bei dem Anteil der Probanden bei denen ausgewählte Phyla, Gattungen und Arten identifiziert wurden.

3.8 Variabilität des oralen Mikrobioms bei gesunden erwachsenen Personen

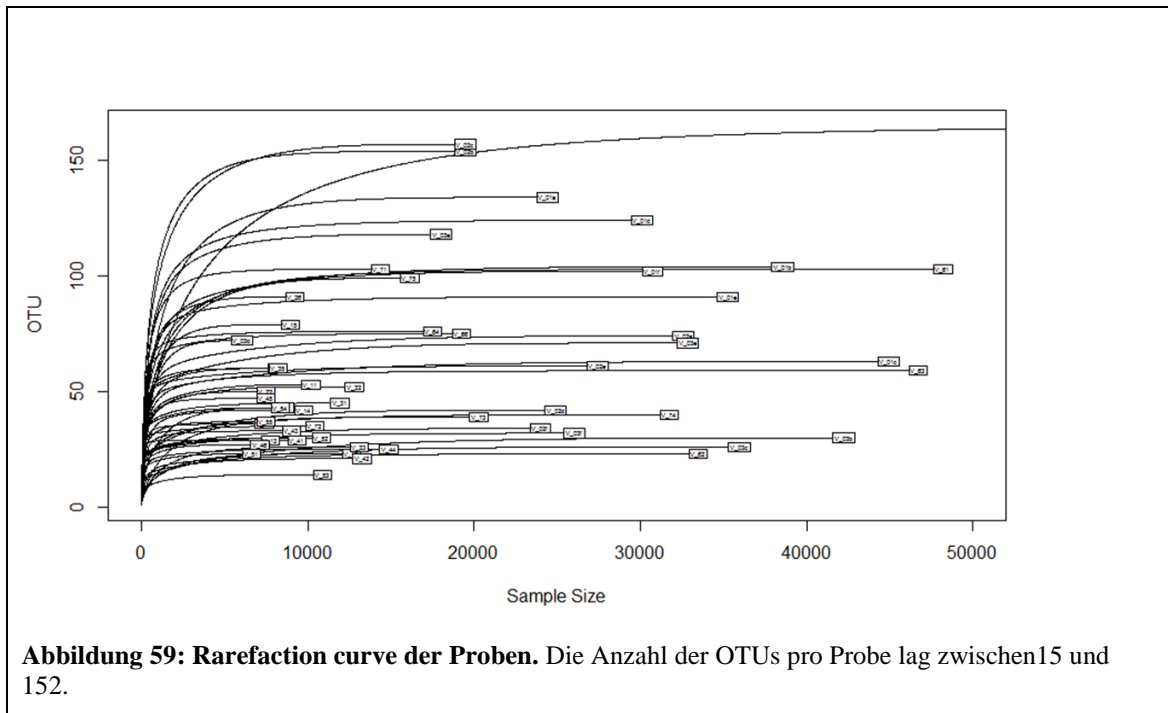
In diesem Projekt sollte die zeitliche Variabilität des oralen Mikrobioms bei zwei erwachsenen Personen untersucht werden. Beide Personen entnahmen sich selbst insgesamt sechs Mal am Tag einen Abstrich. Details hierzu sind unter 2.3.4 und 2.4.4 nachzulesen.

3.8.1 Probanden

Beide Probanden zeigten ein klinisch gesundes Gebiss, wobei der Zahnstatus nicht von einem Zahnarzt aufgenommen wurde, sondern vielmehr nach der eigenen Empfindung und dem letzten Zahnarztbesuch (nicht länger als sechs Monate) berichtet wurde. Beide Probanden waren Nichtraucher und hatten keine Antibiotikakur in den letzten drei Monaten. Das Alter war 26 und 27 Jahre zum Zeitpunkt der Probenentnahme.

3.8.2 Qualität der Proben

Von insgesamt 84 Proben konnten 56 Proben mit mehr als 4.500 reads für die weitere Analyse verwendet werden. Pro Probe konnten zwischen 15 und 152 OTUs identifiziert werden. Die durchschnittliche Sequenziertiefe betrug 20.141 reads (Abbildung 59).



3.8.3 Mikrobiomdaten

In diesem Abschnitt werden die Daten der mikrobiologischen Untersuchung der Proben zur Variabilität näher beschrieben.

3.8.3.1 Rang-Häufigkeitsverteilung der OTUs

Drei der häufigsten OTUs konnten der Gattung *Streptococcus* zugeordnet werden. Insgesamt machen diese drei Gattungen nahezu 50% der gesamten identifizierten OTUs aus (Abbildung 60). Zwölf OTUs konnten häufiger als 1% in den Proben identifiziert werden. Zwei dieser OTUs waren nicht bis zur Gattungsebene zu identifizieren.

3.8.3.2 Identifizierung der Klassen innerhalb der Proben

Auf Ebene der Klassen zeigten sich bei Proband 1 Unterschiede zwischen den entnommenen Proben vor und nach dem Zähneputzen und vor und nach dem Mittagessen. Vor dem Zähneputzen wurden hier vermehrt Betaproteobacteria und Gammaproteobacteria vorgefunden. Bei Proband 2 waren derartige Unterschiede nicht festzustellen (Abbildung 61).

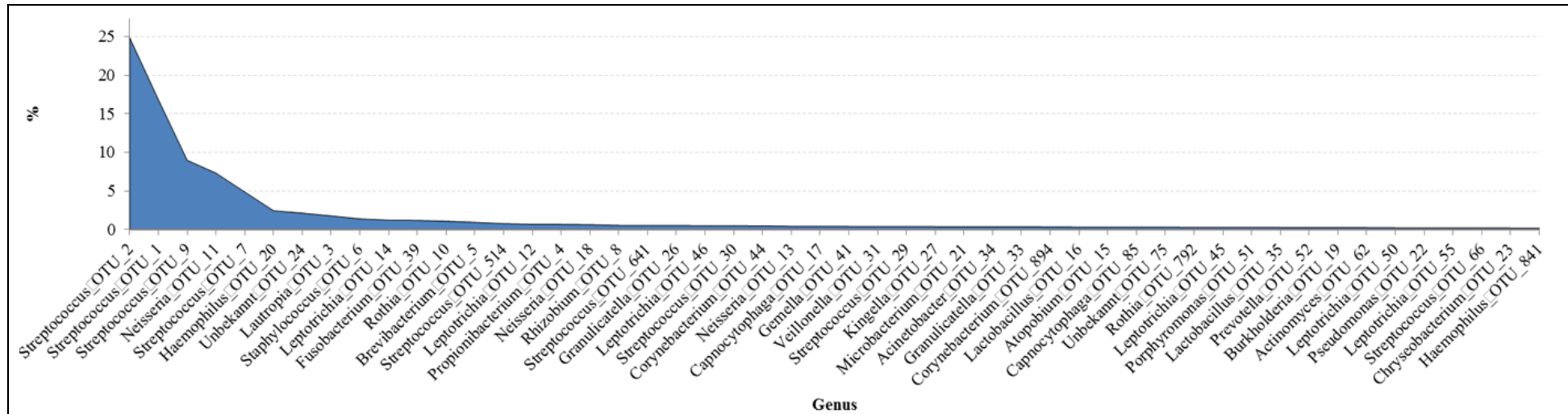


Abbildung 60: Rang-Häufigkeit Verteilung der identifizierten Klassen des Projektes zur Variabilität des oralen Mikrobioms (Top50). Die häufigsten OTUs konnten der Gattung *Streptococcus* zugeordnet werden. Mehr als ein Viertel der OTUs zählte hierzu. Auch die Gattung *Fusobacterium* war insgesamt häufig vertreten. 15 OTUs waren häufiger als 1% in den Proben vertreten.

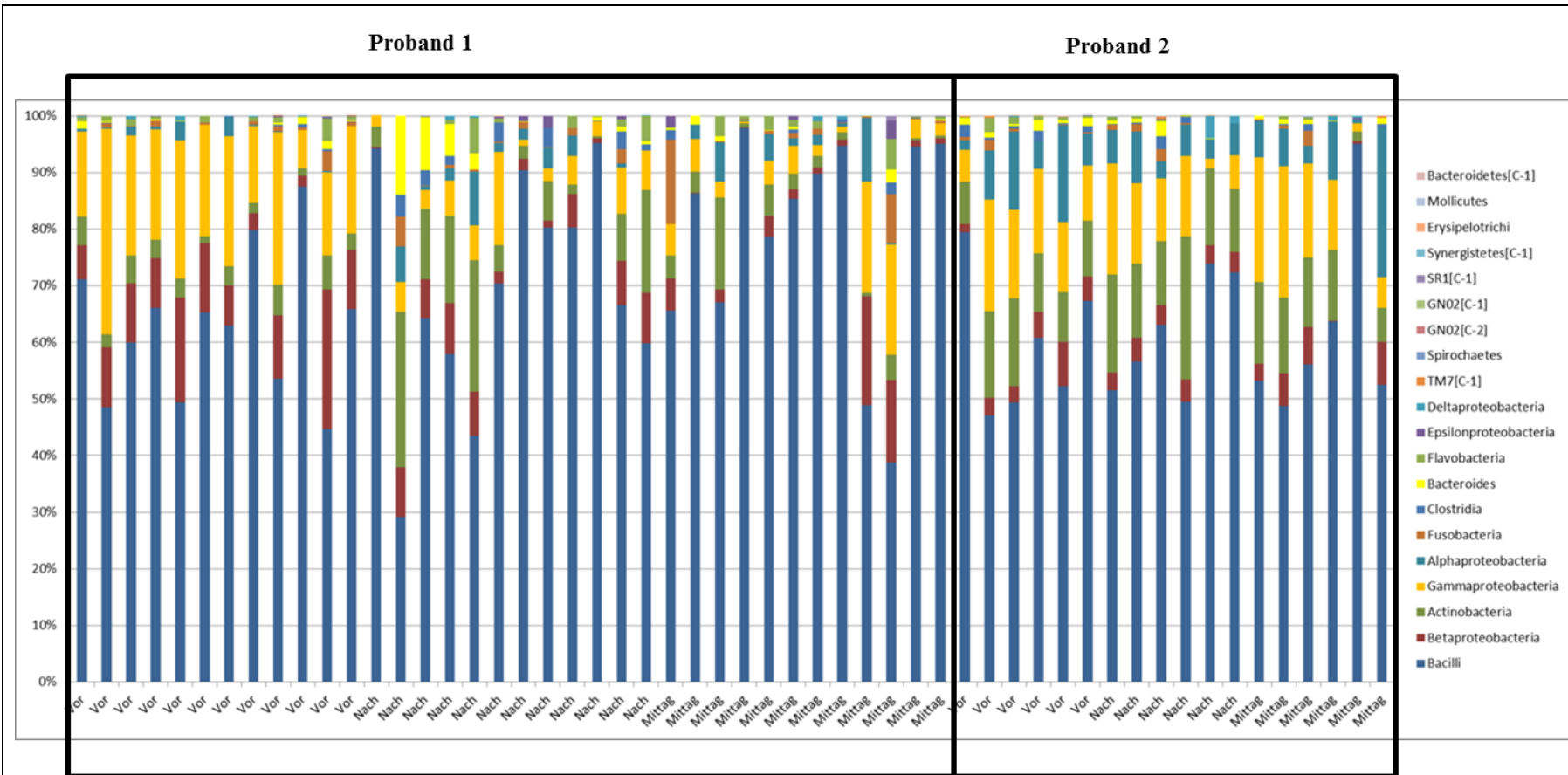
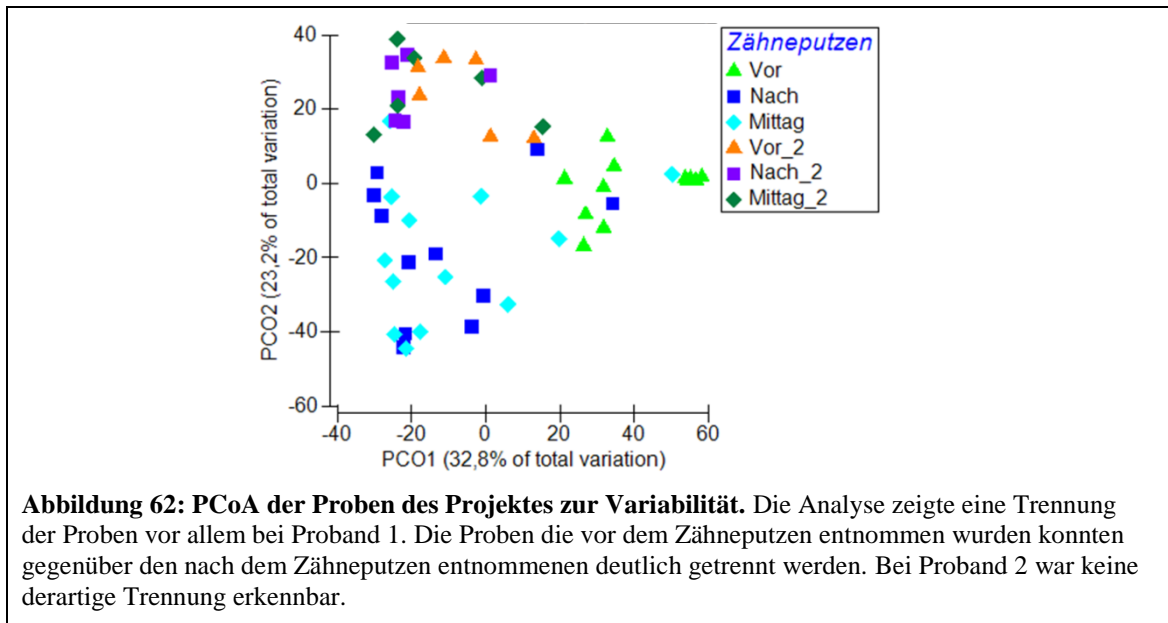


Abbildung 61: Identifizierte Klassen sortiert nach Entnahmezeitpunkt der Proben. Alle Proben wurden von Bacilli dominiert. Betaproteobacteria und Actinobacteria kommen folgten dieser Dominanz Gammaproteobacteria sind bei Proband 1 vorwiegend vor dem Zähneputzen dominierend. Die Proben zur Mittagszeit waren teilweise gemischt von der Zusammensetzung auf Klassenebene. Bei Proband 2 war keine klare Trennung erkennbar zwischen den einzelnen Tageszeiten.

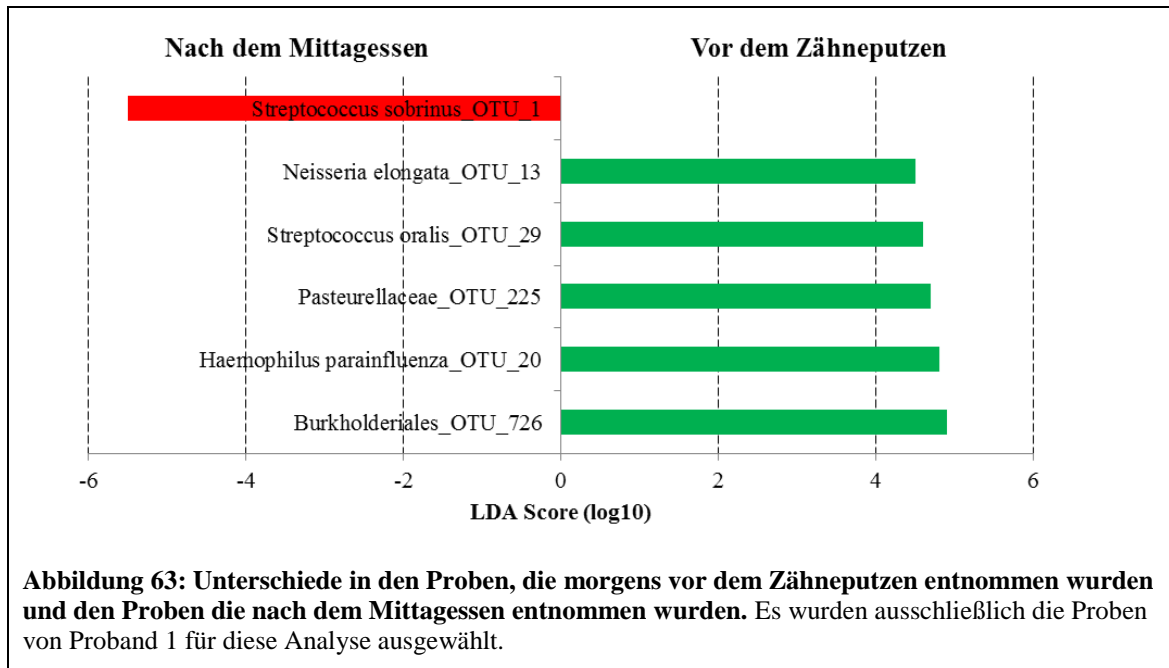
3.8.3.3 Hauptkomponentenanalyse

Die PCoA zeigte eine Gruppierung der Proben nach Proband, sowie nach Entnahmezeitpunkt (Abbildung 62). Während bei Proband 1 hier die Gruppierung deutlich sichtbar war, ist dies bei Person 2 nicht derart offensichtlich gewesen. Die Proben nach dem Mittagessen ähnelten sich mit den Proben, die nach dem Zähneputzen entnommen wurden.



3.8.3.4 Linear Discriminant Analyse

Mit Hilfe der LDA konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Proben nach dem Mittagessen und vor dem Zähneputzen identifiziert werden. Nach dem Mittagessen waren vermehrt OTUs, die der Art *Streptococcus sobrinus* zugeordnet werden konnten, zu finden. Demgegenüber zeigte sich vor dem Zähneputzen ein vermehrtes Auftreten von OTUs die den Arten *Neisseria elongata*, *Streptococcus oralis*, der Familie Pasteurellaceae und der Art *Haemophilus parainfluenza* zugeordnet werden können. Am deutlichsten war ein Unterschied bei einem OTU zu erkennen, dass der Gattung Burkholderiales zugeordnet werden konnte (Abbildung 63). Weitere Gruppen, beziehungsweise Unterschiede zwischen den Proben konnten nicht nachgewiesen werden.



Zusammengefasst zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der mikrobiellen Zusammensetzung zwischen einer Plaque, die über Nacht beziehungsweise ohne Nährstoffe gewachsen ist und einer Plaque, die gereift ist. So konnte *Streptococcus sobrinus* als Bakterium identifiziert werden, dass als Biomarker einer gereiften Plaque gefunden werden konnte. Gleichmaßen konnten Biomarker einer nicht-säureproduzierender Plaque gefunden werden.

4 Diskussion

4.1 Statistische Analyse der Milchzahnkaries bei Kindern in Braunschweig

Diese Analyse zeigte, dass die Karies mit einem durchschnittlich gemessenen dmft-Index von 1 noch immer von großer Bedeutung ist und es zahlreiche Kinder gibt, die an dieser Krankheit leiden. So konnte gezeigt werden, dass Karies in Braunschweig auf Stadtteilebene bei Kindern zwischen drei und sechs Jahren unterschiedliche Verteilungsmuster aufweist. Ferner zeigte der Kariesverlauf dieser Altersklasse von 2009 bis 2014 in Braunschweig eine Abnahme. Zudem konnten mit Hilfe dieser Arbeit Regionen identifiziert werden, die einen Anstieg des dmft-Index zu verzeichnen hatten. Ebenso konnte eine Gruppierung des dmft-Index nachgewiesen werden. Nach Hinzunahme der Soziodemographischen Faktoren in das Modell, das zur Analyse genutzt wurde, zeigte sich keine Gruppierung des Index mehr. Dies deutet darauf hin, dass die Gruppierung durch den Anteil der arbeitslosen Personen und den Anteil der Personen mit Migrationshintergrund erklärt werden kann. Wichtig zu erwähnen ist, dass aus dieser Analyse nicht geschlossen werden kann, dass diese beiden Faktoren als Risikofaktoren für Karies gewertet werden können.

Die Vorteile dieser Analyse liegen eindeutig in der als gut zu bewertenden Datenlage. Die Daten wurden von erfahrenen Zahnärzten gesammelt, die regelmäßig geschult und trainiert werden. Zudem wurden die Analysen mit neuesten Methoden durchgeführt, die für ein Zusammenspiel von geographischen und sozioökonomischen Daten ausgelegt sind. Da in dieser Analyse räumliche Einflüsse untersucht werden sollten, war das Nutzen der hier zugrunde liegenden Daten pro Stadtteil ein klarer Vorteil. Zu beachten ist jedoch bei Daten, die in Kindergärten und Kindertagesstätten gesammelt werden, dass die Kinder nicht zwangsweise in dem Stadtteil wohnen, in dem sie eine derartige Einrichtung besuchen. Somit besteht die Möglichkeit einer Fehleinschätzung der Ergebnisse. Weiterhin zählen zum sozioökonomischen Faktor nicht nur der Anteil an arbeitslosen Personen, sondern zusätzlich noch Daten, die auf die staatliche Unterstützung (nach Sozialgesetzbuch II/„Hartz IV“), hinweisen. Hier lagen jedoch nur Daten aus dem Jahresende 2012 vor, welche nicht repräsentativ für das gesamte Jahr waren, sondern unverhältnismäßig hohe Werte repräsentierten. Der Anteil an Personen mit Migrationshintergrund pro Stadtteil zählt strenggenommen nicht zu den sozioökonomischen Faktoren. Dennoch ist es legitim diese Daten für eine Stadtteilbeschreibung zu nutzen. Theoretisch lagen auch noch Daten zu der staatlichen

Unterstützung Minderjähriger (nach Sozialgesetzbuch II) vor. Problematisch hierbei ist, dass nur ein Bruchteil der Eltern, die Anspruch auf derartige Zuschüsse hätten, diese auch tatsächlich anmelden. Es wird vermutet, dass lediglich zwei Drittel der Kinder (unter 15 Jahren) diese Zuwendungen auch erhalten (Becker, 2007). Weiterhin ist zu beachten, dass die Zahndaten aus dem Jahre 2014 mit Sozialdaten von 2012 in dem Modell analysiert wurden. Die heutige Zeit ist unter anderem charakteristisch für ein positives wirtschaftliches Wachstum, aber auch für eine große internationale Bewegung (zum Beispiel durch Flüchtlinge). Daher ist es durchaus möglich, dass die Stadtteildaten durchaus eine Veränderung von 2012 bis 2014 erfahren haben könnten. Für die verwendete Datenlage spricht, dass ein großer Flüchtlingsstrom erst nach 2015 in Deutschland angekommen ist, also auch nach Abschluss der Datensammlung der Zahndaten. Eine bessere Aufschlüsselung des dmft-Index wäre noch möglich gewesen, wenn Daten zur elterlichen Bildung und dem Einkommens vorgelegen hätten, da, wie bereits angedeutet, der Anteil der arbeitslosen Personen lediglich ein Teil des sozioökonomischen Status ist. Dem gegenüber steht allerdings, dass es in einer ökologischen Analyse nicht zwingend entscheidend ist, wie der individuelle sozioökonomische Status ist, sondern vielmehr, wie der Stadtteil aufgestellt ist, da auf dieser Ebene auch die Zahndaten betrachtet wurden. Bezug nehmend auf die Zahndaten fällt auf, dass weder Informationen zur Speichelzusammensetzung, des Nahrungsverhalten oder auch einer Veränderung des Zahnschmelzes zur Verfügung standen. Auch gibt es keine Informationen über die Zusammensetzung der Zahnplaque. Diese Komponenten wären durchaus interessant bei einer zukünftigen Betrachtung. Eine Wasserfluoridierung wird in vielen Ländern bereits standardmäßig für eine Kariesprävention genutzt und daher kommt die Frage auf, wie der Fluoridierungsstatus in dieser Studie einzuschätzen ist. In Deutschland ist keine flächendeckende Fluoridierung gängig und somit kann hier keine Aussage zu getroffen werden. Ebenfalls fehlen Daten, die auf eine Fluoridierung seitens der Zahnärzte hinweisen. Fraglich bleibt jedoch, ob die Anwendung von Fluorid tatsächlich kariespräventiv wirkt.

Möchte man diese Studie mit anderen vergleichen, die ähnliche Analysen verwendet haben fällt auf, dass die Studienlage durchaus als unzureichend beschrieben werden kann. Zwei Studien konnten gefunden werden, die einen Vergleich zwischen dem sozioökonomischen Status und dem Kariesstatus durchgeführt haben (Adloff et al., 2010, Pereira et al., 2010). Eine dieser Studien nutzte ebenfalls eine räumliche Analyse. Beide Studien kamen zu dem Ergebnis, dass ein niedriger sozioökonomischer Status mit einem gestiegenen dmft-Index korreliert. Auffällig ist, dass die Stadtteile mit einem hohen dmft-Index in der Lage variieren. So sind in Braunschweig diese Stadtteile zentrumsnah, während in Picarabia/Brasilien die Stadtteile mit einem niedrigen sozioökonomischen Status und hohem dmft-Index außerhalb liegen (Pereira et al.,

2010). Diese Tatsache deutet auf eine unterschiedliche Städtestruktur hin und führt nicht zu den möglichen Faktoren für einen erhöhten dmft-Index.

Betrachtet man weitere Auffälligkeiten der Daten, so kommt man zu den beiden Stadtteilen, die einen Anstieg des dmft-Index zu verzeichnen haben (Stadtteil 17 und Stadtteil 20). Nach Aussage der zuvor gezeigten und diskutierten Ergebnisse müsste hier ein erhöhter Anteil an Personen mit Migrationshintergrund und ebenso ein erhöhter Anteil an arbeitslosen Personen wohnen. Allerdings fällt auf, dass hier keinerlei Unterschiede dieser beiden Faktoren im Vergleich mit den übrigen Stadtteilen vorliegen. Eine mögliche Lösung mag hier in dem benachbarten Stadtteil 18 liegen. Dieser Stadtteil weist einen hohen Anteil an arbeitslosen Personen und an Personen mit Migrationshintergrund auf. Möglicherweise gehen die Kinder aus Stadtteil 18 in Kindertagesstätten in den Stadtteilen 17 und 20. Abschließend geklärt werden könnte diese Mutmaßung jedoch nur dann, wenn die Meldedaten zugrunde liegen würden. Auf der Suche nach weiteren Faktoren für eine schlechte Mundgesundheit stößt man neben dem Zahnputzverhalten, das nicht untersucht wurde, auf die Art der aufgenommenen Nahrung. So liegen Studien vor, die eine zuckerhaltige Nahrung vorwiegend für Personen mit einem niedrigen sozioökonomischen Status beschreiben (Hobdell et al., 2003b, Mbawalla et al., 2010). Bekanntermaßen führt zuckerreiche Ernährung zu einer erhöhten Kariesprävalenz (Touger-Decker und van Loveren, 2003). Dies erklärt jedoch nicht den Zusammenhang zwischen erhöhten dmft-Indizes und dem Anteil der Personen mit Migrationshintergrund. Ein aktueller Review berichtet von verringerten Vorzügen für Migranten in Deutschland vom Gesundheitssystem (Aarabi et al., 2013). Hauptsächlich verantwortlich hierfür ist eine verringerte Frequenz von Zahnarztbesuchen aufgrund von soziokulturellen Unterschieden und Problemen im Sprachverständnis (Aarabi et al., 2013).

Um nun die von der WHO ausgegeben Ziele zu erreichen und 80% der Kinder mit Milchzähnen kariesfrei zu bekommen (Hobdell et al., 2003a, Ziller et al., 2006), müssen gezielte Interventionen gestartet werden. So sollten neben regelmäßigen Besuchen von Zahnärzten in den Kindertageseinrichtungen noch zusätzliche Prophylaxeveranstaltungen in den Kindergarten mit hohem Kariesrisiko durchgeführt werden. Ein hohes Kariesrisiko bedeutet in diesem Kontext ein durchschnittlicher dmft-Index von 1 oder größer. Weiterhin ist es denkbar, dass Kinderärzte und Zahnärzte enger zusammenarbeiten. Während die Kinder häufig zu Vorsorgeuntersuchungen bei den Kinderärzten vorstellig werden, sind viele Kinder erst ab ihrem dritten Lebensjahr oder später vorstellig bei einem Zahnarzt (Slack-Smith, 2003). Zukünftig könnten derartige Analysen dafür genutzt werden, um Stadtteile, die ein gesteigertes Risiko für Karieserkrankungen aufweisen, zu identifizieren.

4.2 Überblick über die Ergebnisse der Mikrobiom-Sequenzierung aller Studien

Die allgemeine Analyse der mikrobiologischen Daten diene als Vorarbeit für die Analyse der Daten innerhalb der einzelnen Projekte. Die Zahl der OTUs und die Zuordnung zu einer Art/Gattung zeigte ein nicht ungewöhnliches Verteilungsmuster. So sind häufig bis zu 70% der OTUs bis auf mindestens Gattungsebene zu bestimmen (Szafranski et al., 2014). Ob OTUs bis auf die Artebene aufgeschlüsselt werden können, hängt von der Qualität und Länge der Sequenz ab. Die Anzahl der OTUs ist in dieser Arbeit etwa doppelt so hoch wie die bereits beschriebene Anzahl (954 zu 455 OTUs) (Diaz et al., 2012). Die Zusammensetzung der Mikrobiellen Gemeinschaften ist nicht vergleichbar mit den bereits veröffentlichten Arbeiten, die mit 454-Pyrosequenzierung die mikrobielle Zusammensetzung der Zahnplaque untersucht haben (Xu et al., 2014). In dieser Studie wurden im Vergleich mit Xu et al. eine größere Anzahl an Phyla (16 vs 8), Klassen (33 vs. 15), Ordnungen (58 vs. 21), Familien (115 vs. 30), Gattungen (218 vs. 41) und Arten (195 vs. 99) festgestellt. Diese Unterschiede können teilweise durch die unterschiedlichen Techniken begründet werden. Mit derartig großen Abweichungen war jedoch nicht zu rechnen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, liefern NGS-Daten weitaus tiefere Einblicke in mikrobielle Lebensgemeinschaften. Durch die zuvor festgelegten Qualitätskriterien (4500 reads pro Probe, keine Singletons und Doubletons, mindestens 0,001% Abundanz eines OTUs pro Probe und Projekt) können die entstandenen und im Weiteren analysierten Sequenzen durchaus als zuverlässig und verwertbar gewertet werden. Um eine noch bessere Auflösung der Daten zu erhalten, können noch zusätzlich zu der variablen Region 1 und 2 der 16S rRNA weitere, bevorzugt längere Regionen sequenziert werden. Zwar steigert dies die Kosten und den Arbeitsaufwand, jedoch wird auch die Zuverlässigkeit der taxonomischen Zuordnung gesteigert. Durch eine Kombination mehrerer Regionen kann die Aussagekraft ebenfalls gesteigert werden (Szafranski et al., 2014, Chakravorty et al., 2007). So könnten etwa die variablen Regionen 2, 3 und 6 eine hohe Auflösung liefern (Chakravorty et al., 2007). Auch der Vergleich mehrerer Regionen miteinander liefert teilweise unterschiedliche Profile in der Zusammensetzung von bakteriellen Lebensgemeinschaften (Szafranski et al., 2014). Für jedes Projekt sollte zudem zuvor abgestimmt werden, welche Mikroorganismen betrachtet werden sollen (Chakravorty et al., 2007).

Diese Arbeit weist mehrere Limitationen auf, die begründet durch die hohe Anzahl an Proben sind, die weniger als 4.500 reads pro Probe erreicht haben. Mehr als die Hälfte aller Proben (314 Proben von 680 Proben) konnte daher nicht für die Analyse genutzt werden. Ebenfalls auffällig war eine starke Variabilität innerhalb der Proben

hinsichtlich der Anzahl der OTUs. Zusätzlich konnte ein geringer Prozentsatz der Variabilität mit der Hauptkomponentenanalyse erklärt werden. Vielfach war dieser Prozentsatz geringer als 50%. Die Ursachen hierfür (vor allem für die große Anzahl an nicht verwertbaren Proben) sind vielfältig. Beginnend bei der Probenentnahme ist eine unzureichende Entnahme der Zahnplaque möglich. Fraglich ist, ob die Swabs nicht geeignet sind für eine Entnahme der Zahnplaque, oder ob das Studienpersonal nicht adäquat die Plaque entnommen hat. Ebenfalls denkbar ist, dass die Bakterien nach der Entnahme und vor der DNA-Extraktion nicht vollständig von dem Swab abgelöst werden konnten. Zudem wurde für die Konservierung der Swabs *RNAlater* verwendet. Diese Konservierungslösung könnte zu einer Verdünnung der Probe geführt haben. Auch die Effizienz der DNA-Extraktion könnte unzureichend gewesen sein. Hier drunter zu verstehen ist, dass insbesondere seltene Arten bei einer zu geringen Effizienz nicht erfasst werden. Ebenfalls können bei der Herstellung der Amplikons nicht an alle Sequenzen die entsprechenden Barcodes angebaut worden sein. Im weiteren Verlauf wurde zu der Aufbereitung der Proben eine Gelextraktion durchgeführt. Auch dieser Schritt ist als mögliche Fehlerquelle nicht zu vernachlässigen. Häufig entstehen auch zusätzliche PCR-Produkte bei einer Amplikon-PCR. So kann auch die zusätzliche Bande mit dem gewollten DNA-Produkt zusammen extrahiert worden sein. Diese zusätzliche Bande kann bei der Sequenzierung als Störfaktor betrachtet werden, weil hierdurch Bindestellen in der Flow-Cell fehlerhaft besetzt werden. Dies wiederum führt zu einer verringerten Sequenzier-effizienz. Zusätzlich ist denkbar, dass entweder eine zu geringe DNA-Menge für die Sequenzierung eingesetzt wurde oder nicht alle Amplikons an der Flow-Cell gebunden haben. Auch der Sequenzierdurchlauf ist nicht fehlerfrei, sodass auch hier ein Verlust an reads vorkommen könnte.

Für eine konsequente Fehlervermeidung sollte zukünftig ein Protokoll genutzt werden, das Speichelkontaminationen verhindert. Anstelle von Swabs sollten sterile Exkavatoren genutzt werden. Die hier genutzte Methode mit drei PCR-Schritten sollte derart optimiert werden, dass möglichst wenig Schritte durchgeführt werden (bestenfalls eine PCR zur Verhinderung von einem Bias). Frühere Qualitätskontrollen und einzelne Testdurchläufe sollten für die Sequenzierung implementiert werden, damit sichergestellt ist, dass die geplante Readanzahl (z.B. 30.000 reads pro Probe) erreicht werden kann.

4.3 KraKi-Studie

Mit dieser in Braunschweig durchgeführten KraKi-Studie konnten mehr als 200 Teilnehmer rekrutiert werden. Die Studie umfasste mehrere Studienarme. Zwei dieser Studienarme zielten auf die Untersuchung der Übertragung von Infektionserkrankungen im Haushalt und in den Kindertagesstätten ab. Der dritte Studienarm hatte als Ziel die

Erforschung der mikrobiellen Zusammensetzung der Zahnplaque bei Kindern, sowie dem Wissen und Handeln der Eltern zur Vorbeugung dieser Erkrankung. Ein Großteil der Teilnehmer war bereit, Zahnabstriche von ihren Kindern entnehmen zu lassen.

Für die Studie war eine Teilnehmeranzahl von insgesamt 500 Haushalten geplant. Tatsächlich teilgenommen haben 201 Haushalte. Die geplante Zielgröße wurde verfehlt. Dennoch konnte mit den teilnehmenden Kindertagesstätten eine gute Abdeckung über das gesamte Stadtgebiet erreicht werden. Mögliche Ursachen für ein derart geringes Teilnahmeverhalten lassen sich auf verschiedene Weise begründen. Wichtig zu erwähnen ist an dieser Stelle, dass ein Träger einer Zusammenarbeit an dieser Studie zunächst nicht zugestimmt hat. Somit fielen etwa 70 Kindertagesstätten weg, in denen keine Rekrutierung von Teilnehmern durchgeführt werden konnte. Es fällt auf, dass die Studienpopulation vorwiegend gebildet war. Bei mehr als drei Viertel der Teilnehmer hatte mindestens ein Elternteil einen Hochschulabschluss als höchsten Bildungsgrad. Daher kann ein wissenschaftlicher Gedanke vermutet werden. Auch möglich ist eine altruistische Denkweise als Grund für eine Teilnahme an der Studie. Da im Rahmen dieser Studie kein Geld für die Teilnehmer bezahlt wurde, diente dies nicht als Anreiz teilzunehmen. Fraglich ist, ob ein derartiger Anreiz die Studienpopulation verändert hätte, zu vermuten ist dies jedoch aus den gesammelten Erfahrungen während der Rekrutierung und aus anderen Studien (Groth, 2010).

Bei der Beantwortung der Fragebögen fällt auf, dass häufig derart geantwortet wurde, wie es für eine gute Mundgesundheit der Fall wäre. Auffallend oft wird eine überdurchschnittliche Mundhygiene beschrieben, die auf eine sogenannte „social desirability“ schließen lässt. Dies bedeutet, dass die Studienteilnehmer derart antworten, wie sie denken, was die bestmögliche oder verlangte Antwort zu sein scheint (Leite & Cooper, 2010). Dem gegenüber steht eine gute Mundhygiene aller teilnehmenden Kinder. Von den 5 % der Probanden mit Karies war bei keinem ein beprobter Zahn kariös, beziehungsweise die Proben konnten wegen nicht Erreichen der gewählten Qualitätsstandards nicht in die weitere Analyse miteinbezogen werden. Folglich konnten die Analysen ausschließlich einen Vergleich zwischen den Proben in den einzelnen Kindertagesstätten beinhalten. Doch auch hier blieb nach der Qualitätskontrolle ein zu geringer Probensatz übrig, als dass eine statistisch sichere Aussage getroffen werden könnte. Gründe für eine schlechte Verwertbarkeit der Proben sind vielfältig. Neben nicht optimalen Entnahmebedingungen in den Kindertagesstätten ist es denkbar, dass die Kinder sich nicht kooperativ zeigten. Folglich konnte der Abstrich nicht adäquat durchgeführt werden. Ebenfalls ist nicht bekannt, ob die Kinder vor Entnahme der Probe die Zähne geputzt bekommen haben, wodurch die Plaque noch zusätzlich reduziert wurde. Dennoch zeigten die erhaltenen Proben eine ähnliche

Zusammensetzung wie bei Simon-Soro und Mira, sowie bei Wade beschrieben wurde (Wade, 2013, Simon-Soro und Mira., 2015). Neben Streptokokken sind Neisserien dominierend. Aber auch *Capnocytophaga*, *Leptotrichia*, *Gemella* und *Actinomyces* konnten gefunden werden.

Zusammenhänge zwischen dem Alter und der mikrobiellen Zusammensetzung konnten wie von Lif Holgerson et al. beschrieben (Lif Holgerson et al., 2015) nicht beobachtet werden. Allerdings wurden in der KraKi-Studie auch keine Kinder über einen Zeitraum verfolgt und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Hier wurden lediglich die Mikrobiome von Kindern verschiedenen Alters verglichen betrachtet. Zu erwarten gewesen wären aber auch hier unterschiedliche mikrobielle Zusammensetzungen der Zahnplaque. Weitere Studien, die Probanden über mehrere Jahre beobachten, wären hierfür notwendig. So könnten auch pro Proband und Jahr mehr als eine Plaqueprobe entnommen werden. Denkbar wäre auch, mehrere Besuche seitens der Zahnärzte in den Kindertagesstätten durchzuführen, damit etwaige Krankheitsfälle von Kindern nicht zu einem Probenverlust führen. Wahlweise kann eine Rekrutierung auch in den Kindertagesstätten stattfinden, die Probenentnahme aber von dem jeweiligen Zahnarzt in der Praxis durchgeführt werden. So wären stets beste Entnahmebedingungen gegeben. Demgegenüber steht allerdings ein deutlich erhöhter Aufwand seitens des Studienpersonals und der Teilnehmer. So müssten alle Zahnärzte kontaktiert und geschult werden, wie die Proben entnommen werden sollen. Ein derartiges Studienprotokoll kann vermutlich nur kleinräumig angeboten werden, also lediglich in wenigen Stadtteilen oder aber in kleineren Städten. Wichtig ist es hierbei auf eine repräsentative Studienpopulation zu achten, damit keine Verzerrung durch einen sogenannten „Selection Bias“ entsteht.

Auch diskutiert werden sollte, dass bei den hier entnommenen Proben nicht ausschließlich die Zahnplaque enthalten war. Speichelreste und das entsprechende Mikrobiom sowie möglicherweise Schleimhaut-assoziierte Mikroorganismen könnten in den Proben enthalten sein. Um sicherzustellen, dass ausschließlich die Zahnplaque entnommen wird, muss der Zahn getrocknet werden (Luftdruck) und die Lippe angehoben werden, sodass die Probenentnahme problemlos durchgeführt werden kann. Zukünftig sollte überlegt werden, ob nicht etwa Exkavatoren für die Plaquenentnahme verwendet werden sollten. Auch sterile Holzstäbchen sind ein denkbar gutes Werkzeug. Bei beiden Varianten entfällt ein aufwändiger Trockenprozess der Zähne und die Plaque kann von den Zähnen abgekratzt werden.

Die entnommenen Proben wurden in RNA^{later} konserviert. Diese Maßnahme wurde durchgeführt, weil nicht immer sichergestellt werden konnte, dass die Proben am Entnahmetag durch Kälte (-80 °C) konserviert werden konnten und zusätzlich RNA-

Extraktionen geplant waren. Problematisch war aber möglicherweise das anschließende Vorgehen. Einerseits werden die Proben verdünnt, vor allem dann, wenn nicht die gesamte Probenmenge verwendet wird und andererseits stellt das *RNAlater* ein selektives Medium dar und führt zur Lyse einiger Taxa (Reck et al., 2015).

Bei der KraKi-Studie konnte die zuvor festgelegte Anzahl an Teilnehmern nicht erreicht werden. Die Gründe sind vielfältig und wurden bereits diskutiert. Ebenfalls lieferten die mikrobiologischen Ergebnisse keine entscheidenden Einblicke in das Zahnmikrobiom bei Milchzähnen. Einerseits war die Probenanzahl zu gering und andererseits war ein Vergleich zwischen den Proben von kariösen Zähnen und von gesunden Zähnen nicht möglich, weil keine kariösen Zähne beprobt werden konnten.

4.4 Zahnmikrobiom von indonesischen Kindern

Hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung bei indonesischen Kindern ist auffällig, dass ein großer Anteil der Kinder eine Karieserkrankung hat. So stellte es sich als schwierig dar, überhaupt kariesfreie Kinder zu finden. Entsprechend klein war der Anteil an kariesfreien Kindern in der durchgeführten Analyse. Für statistisch sichere Aussagen war der Unterschied der beiden Gruppen zu gering. Wie auch unter 4.3 diskutiert, war in den hier entnommenen Proben auch ein gewisser Anteil an Bakterien des Speichels und der Schleimhäute enthalten. Zwar wurden die Proben in einer zahnmedizinisch ausgestatteten Einrichtung entnommen, jedoch wurden die Zähne vor der Entnahme nicht getrocknet. Die Negativkontrollen konnten nicht sequenziert werden, von daher kann zumindest von Proben ausgegangen werden, die frei von Umwelt- oder Hautkontaminationen sind.

Nicht überliefert sind Daten hinsichtlich der Mundhygiene. Zwar kann hier von einer schlechten Zahnpflege ausgegangen werden, dennoch wäre es durchaus sinnvoll auch diese Daten zu erheben und in zukünftige Arbeiten miteinfließen zu lassen. Ebenfalls ist nicht bekannt, ob die Kinder in früheren Lebensjahren eine Fluoridapplikation erfahren haben oder nicht. Auch ist nicht überliefert, ob das Wasser fluoridiert wird. Alle diese Maßnahmen sollen einen kariespräventiven Effekt haben und könnten bei derartigen Studien zukünftig mituntersucht werden.

Auffällig war, dass die regionalen Behörden eine hohe Motivation an einer Mitarbeit an diesem Projekt zeigten. So wurden nicht nur die Räumlichkeiten bereitgestellt, sondern auch zusätzliches Personal wurde für die Unterstützung bei der Untersuchung akquiriert. Zukünftig ist es also denkbar nicht nur ein Projekt, sondern eine Studie in Cirebon/West Java (Indonesien) durchzuführen. Sicherlich ist es von Vorteil, Studienpersonal mit Orts- und Sprachkenntnissen vor Ort zu haben, wie es bei diesem

Projekt auch der Fall war. Geklärt werden muss, inwiefern epidemiologische Daten erhoben werden können, ohne dass die Bevölkerung vor Ort abgeschreckt wird (etwa durch zu lange Fragebögen). Mit diesem Projekt konnte gezeigt werden, dass eine Bereitschaft an einer Mitarbeit vorliegt, worauf in Zukunft aufgebaut werden kann.

4.5 Vergleich: KraKi-Studie und Zahnmikrobiom von indonesischen Kindern

Ein Vergleich dieser beiden Studien ist daher möglich, weil die Proben von einer Zahnärztin entnommen wurden, die auch in Braunschweig für die Probenentnahme und die Schulung der Mitarbeiter hauptverantwortlich war. Daher war die Entnahme vergleichbar und hier sollte kein Fehler gesucht werden. Zudem wurden beide Proben nach dem gleichen Protokoll entnommen und verarbeitet. Auch bei der Sequenzierung wurden beide Projekte gemeinsam sequenziert. Somit liegen in der methodischen und technischen Aufbereitung keine Unterschiede vor. Ebenfalls muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass nicht nur die Herkunft der Proben sondern auch der Kariesstatus der Probanden unterschiedlich ist. Der Kariesstatus geht einher mit der Herkunft der Proben. Somit können die gefundenen Unterschiede auch auf den Kariesstatus bezogen werden. Entgegen Peterson et al., die *Streptococcus*, *Veillonella*, *Campylobacter*, *Neisseria*, *Actinomyces* und *Eubacterium* bei Proben von kariösen Zähnen identifizieren konnten (Peterson et al., 2013), waren hier *Abiotrophia_OTU_913*, *Neisseria_OTU_134* und *Granulicatella_OTU_381* dominant bei Karies. Die einzige Überschneidung zeigte sich bei *Neisseria*. Die gefundenen Unterschiede zwischen den beiden Projekten zeigten sich vorwiegend bei gering abundanten OTUs. Dieses Ergebnis geht einher mit weiteren Studien, die ebenfalls die Unterschiede (zwischen Proben von kariösen und nicht kariösen Zähnen) bei den OTUs identifizieren konnten, die gering abundant waren (Peterson et al., 2013, Simon-Soro und Mira., 2015). Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit und der beschriebenen Studien zeigen, dass Karies nicht als Infektionskrankheit, sondern als Polymikrobielle Erkrankung angesehen werden muss (Simon-Soro und Mira., 2015). So kann kein Bakterium oder eine Gruppe von Bakterien identifiziert werden, die stets bei einer Karieserkrankung gefunden werden können. Erst durch das Zusammenspiel vieler Faktoren (Ernährung, Zahn- und Mundhygiene, u.a.) und eine mikrobielle Gemeinschaft, die Säuren produziert und selbst säuretolerant ist, entsteht eine Karies.

4.6 Klinische Proben von Kindern mit und ohne frühkindliche Karies

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Proben von ECC-Probanden und gesunden Probanden gefunden werden. Auffällig war bei Betrachtung der Proben, die von den Schneidezähnen entnommen wurden, dass es zwei Gruppen gab. Während in einer Gruppe ausschließlich Proben von kariösen Zähnen zu finden waren, zeigte sich die zweite Gruppe bestehend aus Zähnen von kariösen und gesunden Zähnen. Wichtig zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass die Kinder bei Probenentnahme zur Zweitvorstellung in der Klinik eintrafen. So wurde bereits bei der ersten Begutachtung der Zähne festgestellt, dass das Gebiss vollständig restauriert werden muss. Möglicherweise haben diese Diagnose und der vorgeschlagene Therapieplan bei den Eltern zu einer Verhaltensänderung geführt. Zwar ist es nicht erfasst worden, wie die Mund- und Zahnhygiene vor der Erstuntersuchung durchgeführt wurde, aber es ist von einer zuckerhaltigen Ernährung und mangelhaftem Zahnputzverhalten auszugehen. Hieraus konnte sich nun die Karies entwickeln und das Gebiss der Kinder derart zerstören, dass eine Behandlung notwendig wurde. Die Verhaltensänderung könnte sein, dass nun die Zähne- trotz bereits bestehender Karies- regelmäßiger geputzt wurden und möglicherweise auch die Nahrung umgestellt wurde. Eine aktive Karies kann durch derartige Maßnahmen aufgehalten werden, auch wenn die bereits bestehenden Läsionen nicht rückgängig gemacht werden können. Möglicherweise stellt sich hier eine mikrobielle Zusammensetzung der Plaque so ein, wie es bei gesunden Zähnen auch der Fall ist. Hierfür spricht, dass in der Gruppe mit ausschließlich Proben von kariösen Zähnen vermehrt bakterielle Gattungen gefunden werden konnten, die mit einer aktiven Karies assoziiert sind. Zu diesen zählen *Neisseria*, *Tannerella* und *Bergeyella* (Teng et al., 2015, Lif Holgerson et al., 2015). Demgegenüber steht, dass keine Unterschiede im Auftreten der Gattung *Prevotella* gefunden werden konnten, die von Yang et al. und Teng et al. mit Karies in Verbindung gebracht worden (Teng et al., 2015, Yang et al., 2012). Für zukünftige Studien wäre es denkbar, dass bereits bei der Erstbegutachtung Zahnabstriche entnommen werden. So kann im weiteren Verlauf ein Vergleich zwischen diesen beiden Proben durchgeführt werden.

Eingehend auf die Kariesaktivität könnten auch hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden. So war es ein ursprüngliches Ziel dieser Studie auch das Metatranskriptom zu untersuchen. Hiermit hätten alle aktiven Gene zum Zeitpunkt der Entnahme identifiziert werden können. Durch die unzureichende Probenlage war eine derartige Analyse allerdings nicht möglich. Zukünftig sollten die Proben für derartige Untersuchungen nicht mit Swabs entnommen werden, sondern mit Exkavatoren.

4.7 Vergleiche der Projekte

Ein Vergleich der zuvor beschriebenen und diskutierten Projekte erscheint zunächst als nicht sinnvoll. So wurde bereits darauf aufmerksam gemacht, dass die Probenentnahme nicht unter den gleichen Bedingungen stattgefunden hat. Ferner gibt es eine Differenz zwischen den Proben, ob eine Speichelkontamination (KraKi-Studie und Zahnmikrobiom indonesischer Kinder) vorhanden war oder nicht (Klinische Proben). So zeigte sich das Rang-Häufigkeits-Verteilungsmuster innerhalb der Projekte global gesehen als unterschiedlich. Die Proben mit Speichelkontamination wiesen zwar auch vermehrt Bakterien der Gattung *Streptococcus* auf, allerdings in anderer Zusammensetzung als dies bei den Proben aus München ohne derartige Speichelkontaminationen der Fall war. Hieraus lässt sich schließen, dass bei derartigen Studien stets darauf geachtet werden sollte, wie die Proben entnommen werden.

Um diese Problematik zu umgehen, wurde bei dem folgenden Vergleich eine Variante gewählt, die ausschließlich das Vorhandensein von ausgewählten Phyla, Gattungen und Arten betrachtete. Dieser Vergleich wurde in Anlehnung an eine bereits zuvor durchgeführte Studie gestaltet (Lif Holgerson et al., 2015). Überraschend zeigte sich der geringe Anteil an Probanden mit ECC, bei denen die Phyla TM7 und SR1 gefunden werden konnten. So sind vor allem diese Phyla bei Karieserkrankungen häufig vorkommend und sollten bei mehreren Probanden identifiziert werden, als dies hier der Fall war. Auffällig ist auch die hohe Homogenität auf Gattungsebene der klinischen Proben. Diese wird jedoch bei Betrachtung auf Artebene aufgelöst. So kann hier auch eine Tendenz zu einer unterschiedlichen mikrobiellen Zusammensetzung bei Kindern mit und ohne ECC gesehen werden.

4.8 Variabilität des oralen Mikrobioms im Tagesverlauf

Diese Proben wurden von erwachsenen Probanden und nicht von Kindern entnommen. Zunächst diente dieses Projekt zur Überprüfung der Methoden.

Die Proben in diesem Projekt wurden durch Selbstbeprobung gewonnen. Die Gefahr bei einer derartigen Entnahmestrategie liegt im Einbringen von Kontaminationen in das Probenmaterial. Bei guter Schulung der Probanden kann dies allerdings ausgeschlossen werden. Eine hohe Reproduzierbarkeit sollte in diesem Falle gegeben sein. Ebendies zeigte sich auch in den Daten. So wurde bei einem Probanden herausgefunden, dass es Unterschiede der mikrobiellen Zusammensetzung vor dem Zähneputzen und nach der Nahrungsaufnahme gibt. Die entsprechenden Proben zeigten sich hierbei sehr konsistent. Bei dem zweiten Probanden konnte etwas derartiges nicht nachgewiesen werden. Die Zahnplaque war in allen Fällen annähernd gleich. Möglicherweise war die

Frequenz der Nahrungsaufnahme oder aber die Art der Nahrung nicht derart, dass eine Selektion der Mikroorganismen nicht stattfinden konnte. Auch denkbar ist, dass durch das Zähneputzen die Plaque nur ausgedünnt, aber nicht vollständig entfernt wurde. Ebenfalls kann es sein, dass die verwendete Zahnpasta bestimmte Inhaltsstoffe hatte, die ein Wachstum inhibierte. Demgegenüber steht der erste Proband, bei dem deutliche Unterschiede festgestellt werden konnten. *Streptococcus sobrinus* ist bekannt dafür, nach der Nahrungsaufnahme vermehrt zu wachsen und die Plaque zu dominieren (Conrads et al., 2014). *Neisseria elongata* ist ein kommensales Bakterium der Mundflora und wird häufig im Zusammenhang mit Endocarditis beschrieben (Yoo et al., 2014). Es konnten keine Studien gefunden werden, die darauf hindeuten, weshalb dieses Bakterium vorwiegend nach dem Zähneputzen dominant zu sein scheint. Es ist zu vermuten, dass hier hauptsächlich Mikroorganismen vorkommen, die auch mit einem geringen Nahrungsangebot und dem Speichel als Nährstoffquelle überleben können. Nicht bekannt ist, welche Aktivität dieses Bakterium in der hier gefundenen Plaque zeigte. Wie bereits zuvor diskutiert, sollte dies auch hier für zukünftige Studien beachtet werden.

Schlussfolgernd kann aus diesem Projekt eine Plaque beschrieben werden, die für die frühe Besiedlung der Zähne verantwortlich sein könnte. So konnte auch nur bei einem von zwei Probanden ein Unterschied in der Plaque vor und nach Zähneputzen festgestellt werden. Über den Tagesverlauf hinweg scheint sich die Plaque nicht zu verändern. Als größter Störfaktor kann in einem Fall das Zähneputzen festgestellt werden. Zwei Personen sind allerdings eine zu geringe Anzahl an Probanden. Zwar ist die Datenlage pro Proband als gut zu bezeichnen, weil sieben Proben pro Entnahmezeitpunkt vorlagen, allerdings braucht es für eine Validierung der hier getätigten Schlussfolgerung eine weitaus größere Studienpopulation.

5 Fazit

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen hohen dmft-Werten und soziodemographischen Faktoren (Arbeitslosigkeit und Migrationshintergrund) gezeigt werden. Die genannten soziodemographischen Faktoren erklären die räumliche Verteilung von hohen dmft-Werten. Ferner wurde ermittelt, dass die Karies eine rückläufige Erkrankung ist. Allerdings gibt es Regionen, in denen ein gegenläufiger Trend zu beobachten ist.

Die Analyse des Zahnmikrobioms bei hat mehrere Limitationen, die für die Verbesserungen zukünftiger Studien genutzt werden können. Die gezeigten Daten sind ähnlich zu denen aus der Literatur. Die Karies (hier: frühkindliche Karies) ist eine polymikrobielle Erkrankung, bei der zahlreiche Mikroorganismen sowohl im gesunden, wie auch im kranken Zustand gefunden werden können. Allerdings sind die Häufigkeiten im Falle einer Karies derart verschoben, dass bestimmte Gattungen in größerer Anzahl identifiziert werden konnten. Zu diesen Gattungen zählten vorwiegend *Neisseria*, *Actinomyces*, *Abiotrophia* und *Granulicatella*. Die gefundenen Unterschiede zeigten sich insgesamt bei den gering abundanten OTUs. Folglich sollten diese bei zukünftigen Analysen mehr beachtet werden.

Interessanterweise zeigte sich lediglich bei einer von zwei erwachsenen Personen ein messbarer Effekt des Zähneputzens auf die mikrobielle Zusammensetzung. Zukünftig sollten die Ess- und Putzgewohnheiten der Probanden mit erfasst werden. Auch die Inhaltsstoffe der Zahnpasta (etwa Verwendung von Triclosan oder Chlohexidin) sollten beachtet werden.

6 Literaturverzeichnis

- AARABI, G., REIßMANN, D. R., HEYDECKE, G., FARHAN, D. & KOFAHL, C. 2013. Oral health of people with migration background in Germany –a critical evaluation. *Deutscher Ärzte-Verlag | DZZ | Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* |, 5, 280-287.
- AAS, J. A., GRIFFEN, A. L., DARDIS, S. R., LEE, A. M., OLSEN, I., DEWHIRST, F.E., LEYS, E. J., PASTER B.J. 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, 46 (4), 1407-17.
- ADLOFF, I., HÄBLER, K., HERMANN, S., UHLIG, U. & MEINLSCHMIDT, G. 2010. Mundgesundheit der Berliner Kinder im Schuljahr 2008/2009.
- ANSELIN, L. 2002. Under the hood: Issues in the specification and interpretation of spatial regression models. . *Agricultural economics*, 27(3), 247–267.
- ANTUNES, J. L., NARVAI, P. C. & NUGENT, Z. J. 2004. Measuring inequalities in the distribution of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*, 32, 41-8.
- ARIGBEDE, A. O., BABATOPE, B. O. & BAMIDELE, M. K. 2012. Periodontitis and systemic diseases: A literature review. *J Indian Soc Periodontol*, 16, 487-91.
- ARSLAN, N. 2014. Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota. *World J Gastroenterol*, 20, 16452-63.
- BAGHERIAN, A. & SADEGHI, M. 2013. Association between dental caries and age-specific body mass index in preschool children of an Iranian population. *Indian J Dent Res*, 24, 66-70.
- BAGRAMIAN, R.A., GARCIA-GODOY, F., VOLPE, A.R. 2009. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*. 22-1; 3-8.
- BAYANI, J. & SQUIRE, J. A. 2004. Fluorescence in situ Hybridization (FISH). *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 22, Unit 22 4.
- BECKER, I. 2007. Armut in Deutschland: Bevölkerungsgruppen unterhalb der Alg II-Grenze. *German Socio-Economic Panel Study (SOEP)*, 36f.
- BECKER, S., BOGER, P., OEHLMANN, R. & ERNST, A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analyses of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 66, 4945-53.
- BECKER, M.R., PASTER, B.J., LEYS, E.J. 2002. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*. 40(3):1001-09.
- BENDER, R. 2007. Die Vierfeldertafel. *Dtsch Med Wochenschr*, 132, e33-e35.
- BENTLEY, D. R., BALASUBRAMANIAN, S., SWERDLOW, H. P., SMITH, G. P., MILTON, J., BROWN, C. G., HALL, K. P., EVERS, D. J., BARNES, C. L., BIGNELL, H. R., BOUTELL, J. M., BRYANT, J., CARTER, R. J., KEIRA CHEETHAM, R., COX, A. J., ELLIS, D. J., FLATBUSH, M. R., GORMLEY, N. A., HUMPHRAY, S. J., IRVING, L. J., KARBELASHVILI, M. S., KIRK, S. M., LI, H., LIU, X., MAISINGER, K. S., MURRAY, L. J., OBRADOVIC, B., OST, T., PARKINSON, M. L., PRATT, M. R., RASOLONJATOVO, I. M., REED, M. T., RIGATTI, R., RODIGHIERO, C., ROSS, M. T., SABOT, A., SANKAR, S. V., SCALLY, A., SCHROTH, G. P., SMITH, M. E., SMITH, V. P., SPIRIDOU, A.,

- TORRANCE, P. E., TZONEV, S. S., VERMAAS, E. H., WALTER, K., WU, X., ZHANG, L., ALAM, M. D., ANASTASI, C., ANIEBO, I. C., BAILEY, D. M., BANCARZ, I. R., BANERJEE, S., BARBOUR, S. G., BAYBAYAN, P. A., BENOIT, V. A., BENSON, K. F., BEVIS, C., BLACK, P. J., BOODHUN, A., BRENNAN, J. S., BRIDGHAM, J. A., BROWN, R. C., BROWN, A. A., BUERMANN, D. H., BUNDU, A. A., BURROWS, J. C., CARTER, N. P., CASTILLO, N., CHIARA, E. C. M., CHANG, S., NEIL COOLEY, R., CRAKE, N. R., DADA, O. O., DIAKOUMAKOS, K. D., DOMINGUEZ-FERNANDEZ, B., EARNSHAW, D. J., EGBUJOR, U. C., ELMORE, D. W., ETCHIN, S. S., EWAN, M. R., FEDURCO, M., FRASER, L. J., FUENTES FAJARDO, K. V., SCOTT FUREY, W., GEORGE, D., GIETZEN, K. J., GODDARD, C. P., GOLDA, G. S., GRANIERI, P. A., GREEN, D. E., GUSTAFSON, D. L., HANSEN, N. F., HARNISH, K., HAUDENSCHILD, C. D., HEYER, N. I., HIMMS, M. M., HO, J. T., HORGAN, A. M., et al. 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53-9.
- BIANCONI, E., PIOVESAN, A., FACCHIN, F., BERAUDI, A., CASADEI, R., FRABETTI, F., VITALE, L., PELLERI, M. C., TASSANI, S., PIVA, F., PEREZ-AMODIO, S., STRIPPOLI, P. & CANAIDER, S. 2013. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol*, 40, 463-71.
- BJARNSHOLT, T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl*, 1-51.
- BLASCO, L., FERRER, S. & PARDO, I. 2003. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for in situ identification of wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 225, 115-23.
- BOYAR, R.M., THYLSTRUP, A., HOLMEN, L., BOWDEN, G.H. 1989. The microflora associated with the development of initial enamel decalcification below orthodontic bands in vivo in children living in a fluoridated-water area. *J Dent Res*.68(12):1734-38.
- BRADLEY, R. H., NATIONAL INSTITUTE OF CHILD, H. & HUMAN DEVELOPMENT EARLY CHILD CARE RESEARCH, N. 2003. Child care and common communicable illnesses in children aged 37 to 54 months. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 157, 196-200.
- BRADWAY, S. D., BERGEY, E. J., JONES, P. C. & LEVINE, M. J. 1989. Oral mucosal pellicle. Adsorption and transpeptidation of salivary components to buccal epithelial cells. *Biochem J*, 261, 887-96.
- BUNDESZAHNÄRZTEKAMMER, K. B. 2014. Frühkindliche Karies vermeiden - Ein Konzept zur zahnmedizinischen Prävention bei Kleinkindern.
- CAMARINHA-SILVA, A., JAUREGUI, R., CHAVES-MORENO, D., OXLEY, A. P., SCHAUMBURG, F., BECKER, K., WOS-OXLEY, M. L. & PIEPER, D. H. 2014. Comparing the anterior nares bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environ Microbiol*, 16, 2939-52.
- CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N. & ALLAND, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69, 330-9.

- COLAK, H., DULGERGIL, C. T., DALLI, M. & HAMIDI, M. M. 2013. Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med*, 4, 29-38.
- CONRADS, G., DE SOET, J. J., SONG, L., HENNE, K., SZTAJER, H., WAGNER-DOBLER, I. & ZENG, A. P. 2014. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J Oral Microbiol*, 6, 26189.
- DARVEAU, R. P. 2010. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 8, 481-90.
- DAVID, L. A., MATERNA, A. C., FRIEDMAN, J., CAMPOS-BAPTISTA, M. I., BLACKBURN, M. C., PERROTTA, A., ERDMAN, S. E. & ALM, E. J. 2014. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol*, 15, R89.
- DE ALMEIDA, C. M., PETERSEN, P. E., ANDRE, S. J. & TOSCANO, A. 2003. Changing oral health status of 6- and 12-year-old schoolchildren in Portugal. *Community Dent Health*, 20, 211-6.
- DEEPAK, S., KOTTAPALLI, K., RAKWAL, R., OROS, G., RANGAPPA, K., IWAHASHI, H., MASUO, Y. & AGRAWAL, G. 2007. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics*, 8, 234-51.
- DENTISTRY, A. A. O. P. 2008. Definition of Early Childhood Caries.
- DEWHIRST, F. E., CHEN, T., IZARD, J., PASTER, B. J., TANNER, A. C., YU, W. H., LAKSHMANAN, A. & WADE, W. G. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192, 5002-17.
- DIAZ, P. I., CHALMERS, N. I., RICKARD, A. H., KONG, C., MILBURN, C. L., PALMER, R. J., JR. & KOLENBRANDER, P. E. 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2837-48.
- DIAZ, P. I., DUPUY, A. K., ABUSLEME, L., REESE, B., OBERGFELL, C., CHOQUETTE, L., DONGARI-BAGTZOGLOU, A., PETERSON, D. E., TERZI, E. & STRAUSBAUGH, L. D. 2012. Using high throughput sequencing to explore the biodiversity in oral bacterial communities. *Mol Oral Microbiol*, 27, 182-201.
- DMS V, 2016. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) – Kurzfassung, IDZ,.
- DOHM, J. C., LOTTAZ, C., BORODINA, T. & HIMMELBAUER, H. 2008. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res*, 36, e105.
- DOROZHUKIN, S. V. & EPPLE, M. 2002. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41, 3130-46.
- DOS SANTOS JUNIOR, V. E., DE SOUSA, R. M., OLIVEIRA, M. C., DE CALDAS JUNIOR, A. F. & ROSENBLATT, A. 2014. Early childhood caries and its relationship with perinatal, socioeconomic and nutritional risks: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*, 14, 47.
- DUPUY, A. K., DAVID, M. S., LI, L., HEIDER, T. N., PETERSON, J. D., MONTANO, E. A., DONGARI-BAGTZOGLOU, A., DIAZ, P. I. &

- STRAUSBAUGH, L. D. 2014. Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy: discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One*, 9, e90899.
- EBERSOLE, J. L., DAWSON, D. R., 3RD, MORFORD, L. A., PEYYALA, R., MILLER, C. S. & GONZALEZ, O. A. 2013. Periodontal disease immunology: 'double indemnity' in protecting the host. *Periodontol 2000*, 62, 163-202.
- ESKAN, M. A., JOTWANI, R., ABE, T., CHMELAR, J., LIM, J. H., LIANG, S., CIERO, P. A., KRAUSS, J. L., LI, F., RAUNER, M., HOFBAUER, L. C., CHOI, E. Y., CHUNG, K. J., HASHIM, A., CURTIS, M. A., CHAVAKIS, T. & HAJISHENGALLIS, G. 2012. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol*, 13, 465-73.
- FADINI, G. P. & AVOGARO, A. 2010. Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovasc Res*, 87, 12-21.
- FDI WORLD DENTAL FEDERATION, C. 2015. *The Challenge of Oral Disease – A call for global action. The Oral Health Atlas. 2nd ed. Geneva.*
- FEATHERSTONE, J. D. 2008. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*, 53, 286-91.
- FINE, D. H., TORUNER, G. A., VELLIYAGOUNDER, K., SAMPATHKUMAR, V., GODBOLEY, D. & FURGANG, D. 2013. A lactotransferrin single nucleotide polymorphism demonstrates biological activity that can reduce susceptibility to caries. *Infect Immun*, 81, 1596-605.
- FLEMMING, H. C., NEU, T. R. & WOZNAK, D. J. 2007. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol*, 189, 7945-7.
- FURE, S. & ZICKERT, I. 1990. Root surface caries and associated factors. *European Journal of Oral Sciences*, 98, 391-400.
- GAIL, M. H. & BENICHO, J. 2000. *Encyclopedia of Epidemiologic Methods*.
- GARCIA-CASTILLO, V., SANHUEZA, E., MCNERNEY, E., ONATE, S. A. & GARCIA, A. 2016. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol*, 65, 1347-1362.
- GIBBONS, R. J., COHEN, L. & HAY, D. I. 1986. Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun*, 52, 555-61.
- GILBERT, K., JOSEPH, R., VO, A., PATEL, T., CHAUDHRY, S., NGUYEN, U., TREVOR, A., ROBINSON, E., CAMPBELL, M., MCLENNAN, J., HOURAN, F., WONG, T., FLANN, K., WAGES, M., PALMER, E. A., PETERSON, J., ENGLE, J., MAIER, T. & MACHIDA, C. A. 2014. Children with severe early childhood caries: streptococci genetic strains within carious and white spot lesions. *J Oral Microbiol*, 6.
- GLOBAL BURDEN OF DISEASE, INJURY. & PREVALENCE, 2016. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388, 1545-1602.
- GROTH, S. W. 2010. Honorarium or coercion: use of incentives for participants in clinical research. *J N Y State Nurses Assoc*, 41, 11-3; quiz 22.

- GROUP, N. H. W., PETERSON, J., GARGES, S., GIOVANNI, M., MCINNES, P., WANG, L., SCHLOSS, J. A., BONAZZI, V., MCEWEN, J. E., WETTERSTRAND, K. A., DEAL, C., BAKER, C. C., DI FRANCESCO, V., HOWCROFT, T. K., KARP, R. W., LUNSFORD, R. D., WELLINGTON, C. R., BELACHEW, T., WRIGHT, M., GIBLIN, C., DAVID, H., MILLS, M., SALOMON, R., MULLINS, C., AKOLKAR, B., BEGG, L., DAVIS, C., GRANDISON, L., HUMBLE, M., KHALSA, J., LITTLE, A. R., PEAVY, H., PONTZER, C., PORTNOY, M., SAYRE, M. H., STARKE-REED, P., ZAKHARI, S., READ, J., WATSON, B. & GUYER, M. 2009. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*, 19, 2317-23.
- HAJISHENGALLIS, G. 2014. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol*, 35, 3-11.
- HAJISHENGALLIS, G., PARSAEI, Y., KLEIN, M.I., KOO, H. 2016. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Molecular Oral Microbiology*. 32-1; 24-34.
- HANNIG, C. & HANNIG, M. 2009. The oral cavity--a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin Oral Investig*, 13, 123-39.
- HANNIG, M. & JOINER, A. 2006. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*, 19, 29-64.
- HOBDELL, M., PETERSEN, P. E., CLARKSON, J. & JOHNSON, N. 2003a. Global goals for oral health 2020. *Int Dent J*, 53, 285-8.
- HOBDELL, M. H., OLIVEIRA, E. R., BAUTISTA, R., MYBURGH, N. G., LALLOO, R., NARENDHAN, S. & JOHNSON, N. W. 2003b. Oral diseases and socio-economic status (SES). *Br Dent J*, 194, 91-6; discussion 88.
- HUANG, R., LI, M. & GREGORY, R. L. 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2, 435-44.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT, C. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-14.
- HUMPHREY, S. P. & WILLIAMSON, R. T. 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*, 85, 162-9.
- ISMAIL, A. I. 1997. Clinical diagnosis of precavitated carious lesions. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 25, 13-23.
- JEPSEN, S., DESCHNER, J., BRAUN, A., SCHWARZ, F. & EBERHARD, J. 2011. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontol 2000*, 55, 167-88.
- JONES, B. L., NAGIN, D. S. & ROEDER, K. 2001. A SAS procedure based on mixture models for estimating developmental trajectories. *Sociol Methods Res*, 29, 374-393.
- KANASI, E., DEWHIRST, F. E., CHALMERS, N. I., KENT, R., JR., MOORE, A., HUGHES, C. V., PRADHAN, N., LOO, C. Y. & TANNER, A. C. 2010. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res*, 44, 485-97.
- KASSEBAUM, N.J., BERNABE, E., DAHIYA, M., MURRAY, C.J.L., MARCENES, W. 2015. Global burden of untreated caries. *J Dent Research*. 94:5.

- KIANOUSH, N., NGUYEN, K. A., BROWNE, G. V., SIMONIAN, M. & HUNTER, N. 2014. pH gradient and distribution of streptococci, lactobacilli, prevotellae, and fusobacteria in carious dentine. *Clin Oral Investig*, 18, 659-69.
- KILIAN, M., CHAPPLE, I.L.C., HANNIG, M., MARSH, P.D., MEURIC, V., PEDERSEN, A.M.L., TONETTI, M.S., WADE, W.G.&ZAURA, E.2016. The oral microbiome- an update for healthcare professionals. *BDJ* 221, 657 - 666.
- KOLENBRANDER, P. E. 2011. Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *Int J Oral Sci*, 3, 49-54.
- KOLENBRANDER, P. E., PALMER, R. J., JR., PERIASAMY, S. & JAKUBOVICS, N. S. 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*, 8, 471-80.
- KONONEN, E. 2000. Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med*, 32, 107-12.
- KONONEN, E. & MULLER, H. P. 2014. Microbiology of aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000, 65, 46-78.
- KOWASH, M. B., PINFIELD, A., SMITH, J. & CURZON, M. E. 2000. Effectiveness on oral health of a long-term health education programme for mothers with young children. *Br Dent J*, 188, 201-5.
- LANGFELDT, D., NEULINGER, S. C., HEUER, W., STAUFENBIEL, I., KUNZEL, S., BAINES, J. F., EBERHARD, J. & SCHMITZ, R. A. 2014. Composition of microbial oral biofilms during maturation in young healthy adults. *PLoS One*, 9, e87449.
- LENANDER-LUMIKARI, M. & LOIMARANTA, V. 2000. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*, 14, 40-7.
- LI, J., HELMERHORST, E. J., LEONE, C. W., TROXLER, R. F., YASKELL, T., HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S. & OPPENHEIM, F. G. 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol*, 97, 1311-8.
- LI, X., KOLLTVEIT, K. M., TRONSTAD, L. & OLSEN, I. 2000. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*, 13, 547-58.
- LIF HOLGERSON, P., OHMAN, C., RONNLUND, A. & JOHANSSON, I. 2015. Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. *PLoS One*, 10, e0128534.
- LINGSTRÖM, P., van RUYVEN, F.O., van HOUTE, J., KENT, R.2000. The pH of dental plaque in its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. *J Dent Res*.79(2):770-77.
- LUKOČIENĖ, O. & VERMUNT, J. K. 2010. Determining the Number of Components in Mixture Models for Hierarchical Data. In: FINK, A., LAUSEN, B., SEIDEL, W. & ULTSCH, A. (eds.) *Advances in Data Analysis, Data Handling and Business Intelligence: Proceedings of the 32nd Annual Conference of the Gesellschaft für Klassifikation e.V., Joint Conference with the British Classification Society (BCS) and the Dutch/Flemish Classification Society (VOC), Helmut-Schmidt-University, Hamburg, July 16-18, 2008*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- MARSH P.D., MARTIN, M.V., 2009. Oral Microbiology, ed 5. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- MARSHALL, G. W., JR. 1993. Dentin: microstructure and characterization. *Quintessence Int*, 24, 606-17.
- MATHIS, S. & GARTLEHNER, G. 2008. [Cohort studies]. *Wien Med Wochenschr*, 158, 174-9.
- MATTSON, M. P., ALLISON, D. B., FONTANA, L., HARVIE, M., LONGO, V. D., MALAISSE, W. J., MOSLEY, M., NOTTERPEK, L., RAVUSSIN, E., SCHEER, F. A., SEYFRIED, T. N., VARADY, K. A. & PANDA, S. 2014. Meal frequency and timing in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 16647-53.
- MBAWALLA, H. S., MASALU, J. R. & ASTROM, A. N. 2010. Socio-demographic and behavioural correlates of oral hygiene status and oral health related quality of life, the Limpopo-Arusha school health project (LASH): a cross-sectional study. *BMC Pediatr*, 10, 87.
- MOORTHIE, S., MATTOCKS, C. J. & WRIGHT, C. F. 2011. Review of massively parallel DNA sequencing technologies. *Hugo J*, 5, 1-12.
- MORAN, P. A. 1950. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37, 17-23.
- MUELLER, N. T., BAKACS, E., COMBELICK, J., GRIGORYAN, Z. & DOMINGUEZ-BELLO, M. G. 2015. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*, 21, 109-17.
- MYRIAD, F. W. D. F. 2009. The Oral Health Atlas. ISBN: 978-0-9539261-6-9.
- NIEDERMAN, R., FERES, M. & OGUNBODEDE, E. 2015. Dentistry. In: DEBAS, H. T., DONKOR, P., GAWANDE, A., JAMISON, D. T., KRUK, M. E. & MOCK, C. N. (eds.) *Essential Surgery: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 1)*. Washington (DC).
- NYVAD, B., CRIELAARD, W., MIRA, A., TAKAHASHI, N. & BEIGHTON, D. 2013. Dental caries from a molecular microbiological perspective. *Caries Res*, 47, 89-102.
- PAJU, S. & SCANNAPIECO, F. A. 2007. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis*, 13, 508-12.
- PATIR, A., SEYMEN, F., YILDIRIM, M., DEELEY, K., COOPER, M.E., MARAZITA, M., L., VIEIRA, A., R. 2008. Enamel Formation Genes Are Associated with High Caries Experience in Turkish Children. *Caries Res* 2008;42:394–400.
- PENG, S. M., WONG, H. M., KING, N. M. & MCGRATH, C. 2014. Is dental caries experience associated with adiposity status in preschool children? *Int J Paediatr Dent*, 24, 122-30.
- PEREIRA, C. S., THOMPSON, J. A. & XAVIER, K. B. 2013. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 156-81.
- PEREIRA, S. M., AMBROSANO, G. M., CORTELLAZZI, K. L., TAGLIAFERRO, E. P., VETTORAZZI, C. A., FERRAZ, S. F., MENECHIM, M. C. & PEREIRA, A. C. 2010. Geographic information systems (GIS) in assessing dental health. *Int J Environ Res Public Health*, 7, 2423-36.

- PETERS, B. M., JABRA-RIZK, M. A., O'MAY, G. A., COSTERTON, J. W. & SHIRTLIFF, M. E. 2012. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev*, 25, 193-213.
- PETERSEN, P. E. & OGAWA, H. 2012. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*, 60, 15-39.
- PETERSON, S. N., SNESRUD, E., LIU, J., ONG, A. C., KILIAN, M., SCHORK, N. J. & BRETZ, W. 2013. The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoS One*, 8, e58487.
- PETTI, C. A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis*, 44, 1108-14.
- PICOLOS, D. K., LERCHE-SEHM, J., ABRON, A., FINE, J. B. & PAPAPANOU, P. N. 2005. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol*, 32, 1055-61.
- PIEPER, K. 2009. Epidemiologische Begleituntersuchung zur Gruppenprophylaxe. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Jugendzahnpflege.
- PIHLSTROM, B. L., MICHALOWICZ, B. S. & JOHNSON, N. W. 2005. Periodontal diseases. *Lancet*, 366, 1809-20.
- PUGACH, M. K., STROTHER, J., DARLING, C. L., FRIED, D., GANSKY, S. A., MARSHALL, S. J. & MARSHALL, G. W. 2009. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. *J Dent Res*, 88, 71-6.
- RABIN, N., ZHENG, Y., OPOKU-TEMENG, C., DU, Y., BONSU, E. & SINTIM, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*, 7, 493-512.
- RAJA, M., HANNAN, A. & ALI, K. 2010. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res*, 44, 272-6.
- RECK, M., TOMASCH, J., DENG, Z., JAREK, M., HUSEMANN, P., WAGNER-DÖBLER, I. 2015. Stool Metatranscriptomics: A technical guideline for mrna stabilisation and isolation. *BMC Genomics*, 16:494.
- RICHARDS, W., AMEEN, J., COLL, A. M. & HIGGS, G. 2005. Reasons for tooth extraction in four general dental practices in South Wales. *Br Dent J*, 198, 275-8.
- RKI 2008. Robert Koch-Institut (Hrsg), Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (Hrsg). Erkennen – Bewerten – Handeln: Zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland.
- ROHLKE, F. & STOLLMAN, N. 2012. Fecal microbiota transplantation in relapsing *Clostridium difficile* infection. *Therap Adv Gastroenterol*, 5, 403-20.
- ROYSTON, P., AMBLER, G. & SAUERBREI, W. 1999. The use of fractional polynomials to model continuous risk variables in epidemiology. *Int J Epidemiol*, 28, 964-74.
- SAINI, R., SAINI, S. & SHARMA, S. 2011. Biofilm: A dental microbial infection. *J Nat Sci Biol Med*, 2, 71-5.

- SAMPAIO-MAIA, B., CALDAS, I. M., PEREIRA, M. L., PEREZ-MONGIOVI, D. & ARAUJO, R. 2016. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv Appl Microbiol*, 97, 171-210.
- SATO, Y., YAMAGISHI, J., YAMASHITA, R., SHINOZAKI, N., YE, B., YAMADA, T., YAMAMOTO, M., NAGASAKI, M. & TSUBOI, A. 2015. Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra-Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One*, 10, e0131607.
- SCHULLER, A. A. & HOLST, D. 2001. Oral status indicators DMFT and FS-T: reflections on index selection. *Eur J Oral Sci*, 109, 155-9.
- SCHWABE, R. F. & JOBIN, C. 2013. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*, 13, 800-12.
- SELWITZ, R. H., ISMAIL, A. I. & PITTS, N. B. 2007. Dental caries. *Lancet*, 369, 51-9.
- SENDER, R., FUCHS, S., MILO, R. 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*. 2016;14(8):e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- SIMON-SORO, A. & MIRA, A. 2015. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol*, 23, 76-82.
- SIMON-SORO, A., TOMAS, I., CABRERA-RUBIO, R., CATALAN, M. D., NYVAD, B. & MIRA, A. 2013. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res*, 92, 616-21.
- SIQUEIRA, W. L., HELMERHORST, E. J., ZHANG, W., SALIH, E. & OPPENHEIM, F. G. 2007. Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics. *Ann N Y Acad Sci*, 1098, 504-9.
- SLACK-SMITH, L. M. 2003. Dental visits by Australian preschool children. *J Paediatr Child Health*, 39, 442-5.
- SØVIK, J.,B., VIEIRA, A.,R., TVEIT, A.,B., MULIC, A.2015. Enamel Formation Genes Associated with Dental Erosive Wear. *Caries Res* 2015;49:236-242.
- SZAFRAŃSKI, S. P., DENG, Z.-L., TOMASCH, J., JAREK, M., BHUJU, S., MEISINGER, C., KÜHNISCH, J., SZTAJER, H. & WAGNER-DÖBLER, I. 2015. Functional biomarkers for chronic periodontitis and insights into the roles of *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*; a metatranscriptome analysis. *Npj Biofilms And Microbiomes*, 1, 15017.
- SZAFRAŃSKI, S. P., WOS-OXLEY, M. L., VILCHEZ-VARGAS, R., JAUREGUI, R., PLUMEIER, I., KLAWONN, F., TOMASCH, J., MEISINGER, C., KUHNISCH, J., SZTAJER, H., PIEPER, D. H. & WAGNER-DOBLER, I. 2014. High resolution taxonomic profiling of the subgingival microbiome for biomarker discovery and periodontitis diagnosis. *Appl Environ Microbiol*.
- SZTAJER, H., SZAFRAŃSKI, S. P., TOMASCH, J., RECK, M., NIMTZ, M., ROHDE, M. & WAGNER-DOBLER, I. 2014. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J*.
- TAKAHASHI, N. & NYVAD, B. 2011. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*, 90, 294-303.
- TANNER, A.C., SONIS, A.L., LIF HOLGERSON, P. 2012. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *J Dent Res*. 91(9):853-8.

- TENG, F., YANG, F., HUANG, S., BO, C., XU, Z. Z., AMIR, A., KNIGHT, R., LING, J. & XU, J. 2015. Prediction of Early Childhood Caries via Spatial-Temporal Variations of Oral Microbiota. *Cell Host Microbe*, 18, 296-306.
- TORLAKOVIC, L., KLEPAC-CERAJ, V., OGAARD, B. 2012. Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *J Oral Microbiol.* 4(1):e16125.
- TORRES-ALIPI, B. I., FRAGOSO-RAMIREZ, J. A., MARTINEZ-LIMON, A. J. & BAPTISTA-GONZALEZ, H. A. 1990. [Bacterial colonization of the oral cavity in the newborn]. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 47, 78-83.
- TOUGER-DECKER, R. & VAN LOVEREN, C. 2003. Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr*, 78, 881S-892S.
- Van WINKELHOFF, A., BOUTAGA, K., 2005. Transmission of periodontal bacteria and models of infection. *J Clin Periodontol* 32:16-27.
- VIAUD, S., SACCHERI, F., MIGNOT, G., YAMAZAKI, T., DAILLIERE, R., HANNANI, D., ENOT, D. P., PFIRSCHKE, C., ENGBLOM, C., PITTET, M. J., SCHLITZER, A., GINHOUX, F., APETOH, L., CHACHATY, E., WOERTHER, P. L., EBERL, G., BERARD, M., ECOBICHON, C., CLERMONT, D., BIZET, C., GABORIAU-ROUTHIAU, V., CERF-BENSUSSAN, N., OPOLO, P., YESSAAD, N., VIVIER, E., RYFFEL, B., ELSON, C. O., DORE, J., KROEMER, G., LEPAGE, P., BONECA, I. G., GHIRINGHELLI, F. & ZITVOGEL, L. 2013. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, 342, 971-6.
- VOS, T., FLAXMAN, A. D., NAGHAVI, M., LOZANO, R., MICHAUD, C., EZZATI, M., SHIBUYA, K., SALOMON, J. A., ABDALLA, S., ABOYANS, V., ABRAHAM, J., ACKERMAN, I., AGGARWAL, R., AHN, S. Y., ALI, M. K., ALVARADO, M., ANDERSON, H. R., ANDERSON, L. M., ANDREWS, K. G., ATKINSON, C., BADDOUR, L. M., BAHALIM, A. N., BARKER-COLLO, S., BARRERO, L. H., BARTELS, D. H., BASANEZ, M. G., BAXTER, A., BELL, M. L., BENJAMIN, E. J., BENNETT, D., BERNABE, E., BHALLA, K., BHANDARI, B., BIKBOV, B., BIN ABDULHAK, A., BIRBECK, G., BLACK, J. A., BLENCOWE, H., BLORE, J. D., BLYTH, F., BOLLIGER, I., BONAVENTURE, A., BOUFIOUS, S., BOURNE, R., BOUSSINESQ, M., BRAITHWAITE, T., BRAYNE, C., BRIDGETT, L., BROOKER, S., BROOKS, P., BRUGHA, T. S., BRYAN-HANCOCK, C., BUCELLO, C., BUCHBINDER, R., BUCKLE, G., BUDKE, C. M., BURCH, M., BURNEY, P., BURSTEIN, R., CALABRIA, B., CAMPBELL, B., CANTER, C. E., CARABIN, H., CARAPETIS, J., CARMONA, L., CELLA, C., CHARLSON, F., CHEN, H., CHENG, A. T., CHOU, D., CHUGH, S. S., COFFENG, L. E., COLAN, S. D., COLQUHOUN, S., COLSON, K. E., CONDON, J., CONNOR, M. D., COOPER, L. T., CORRIERE, M., CORTINOVIS, M., DE VACCARO, K. C., COUSER, W., COWIE, B. C., CRIQUI, M. H., CROSS, M., DABHADKAR, K. C., DAHIYA, M., DAHODWALA, N., DAMSERE-DERRY, J., DANAEI, G., DAVIS, A., DE LEO, D., DEGENHARDT, L., DELLAVALLE, R., DELOSSANTOS, A., DENENBERG, J., DERRETT, S., DES JARLAIS, D. C., DHARMARATNE, S. D., DHERANI, M., et al. 2012. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2163-96.

- WADE, W. 2002. Unculturable bacteria--the uncharacterized organisms that cause oral infections. *J R Soc Med*, 95, 81-3.
- WADE, W. G. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*, 69, 137-43.
- WHITTAKER, C. J., KLIER, C. M. & KOLENBRANDER, P. E. 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 50, 513-52.
- WOO, P. C., LAU, S. K., TENG, J. L., TSE, H. & YUEN, K. Y. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*, 14, 908-34.
- WYNE, A. H. 1999. Early childhood caries: nomenclature and case definition. *Community Dent Oral Epidemiol*, 27, 313-5.
- XU, X., HE, J., XUE, J., WANG, Y., LI, K., ZHANG, K., GUO, Q., LIU, X., ZHOU, Y., CHENG, L., LI, M., LI, Y., LI, Y., SHI, W. & ZHOU, X. 2015. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*, 17, 699-710.
- XU, H., HAO, W., ZHOU, Q., WANG, W., XIA, Z., LIU, C., CHEN, X., QIN, M., CHEN, F., 2014. Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. *PLoS One*, 9, 2, e89269.
- YANG, F., ZENG, X., NING, K., LIU, K. L., LO, C. C., WANG, W., CHEN, J., WANG, D., HUANG, R., CHANG, X., CHAIN, P. S., XIE, G., LING, J. & XU, J. 2012. Saliva microbiomes distinguish caries-active from healthy human populations. *ISME J*, 6, 1-10.
- YOO, Y. P., KANG, K. W., YOON, H. S., YOO, S. & LEE, M. S. 2014. Infective endocarditis caused by *Neisseria elongata* on a native tricuspid valve and confirmed by DNA sequencing. *Tex Heart Inst J*, 41, 227-30.
- ZAURA, E., KEIJSER, B.J., HUSE, S.M., CRIELAARD, W., 2009. Defining the healthy 'core microbiome' of oral microbial communities. *BMC Microbiol*, 9:259.
- ZIJNGE, V., VAN LEEUWEN, M. B., DEGENER, J. E., ABBAS, F., THURNHEER, T., GMUR, R. & HARMSSEN, H. J. 2010. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*, 5, e9321.
- ZILLER, S., MICHEELIS, W., OESTERREICH, D. & REICH, E. 2006. Goals for oral health in Germany 2020. *Int Dent J*, 56, 29-32.
- ZIJNGE V, M. A., ABBAS F, HARMSSEN HJM. 2013. Structural organization of oral biofilms in supra- and Subgingival environments. In: JAKUBOVICS NS, P. J. R. (ed.) *Oral Microbial Ecology. Current Research and new perspectives*. Norfolk UK: Caister Academic Press.

7 Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Mentorin Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler für die Stellung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit und dafür, dass ihre Tür für Fragen und Diskussionen offen stand.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Michael Steinert für die freundliche Übernahme des Korreferats und der damit verbundenen Mühen.

Dank schulde ich auch meiner Betreuerin Dr. Helena Sztajer für ihre offene und ehrliche Art, ihre wichtigen Ratschläge für jede Lebenslage und natürlich auch für ihre engagierte und motivierte Betreuung bei dieser Arbeit. Nicht nur ihr liebevolles Engagement, sondern auch ihre wissenschaftliche Neugier sind einmalig.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Rafael Mikolajczyk, Dr. Andrè Karch und die Arbeitsgruppe von ESME. Nicht nur bei der Planung und Durchführung der Studien die zu dieser Arbeit geführt haben wart ihr für mich da, sondern auch bei dem gemeinsamen Mittagessen. Vielen Dank an Nicole Rübsamen und Johannes Horn für diverse Lehrstunden in der Statistik und dem Modellieren.

Hervorheben muss ich hierbei Kristin Maria Schlinkmann. Nicht nur als kompetente Kollegin und Epidemiologin, sondern auch als Mensch habe ich von dir eine Menge gelernt und lerne nie aus.

Ein großes Dankeschön an alle Teilnehmer der Studien und Projekte. Ohne die Bereitschaft die Wissenschaft zu unterstützen, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ebenfalls gebührt ein großer Danke OA PD Dr. Jan Kühnisch (LMU) und seinem gesamten Team, genauso wie insbesondere Henny Sudradjat und ihrem Team für die Probenentnahme in Braunschweig und Indonesien sowie Rainer Schubert vom Gesundheitsamt in Braunschweig für die Unterstützung und die ein oder andere Besprechung bei einem Tee.

Vielen Dank an Kathrin Opolka, die mir bei der Bearbeitung der Proben geholfen hat und somit die Arbeitszeit gefühlt halbiert hat.

Weiterer Dank gilt der GS FIRE für die Erstattung eines Anteils der Reisekosten für die Teilnahme an diversen Konferenzen und die ständige Präsenz und Unterstützung bei Fragen aller Art.

Ich danke allen Kollegen vom HZI für das angenehme Arbeitsklima und stete Hilfsbereitschaft. Besondere Erwähnung finden müssen hierbei:

Jannik, Conni und Michael danke ich für anregende Diskussion und Ablenkung auch mal fernab des Themas oder bei Radtouren auf den Brocken und lockeren Dauerläufen

durch die Asse sowie für die freundliche fachliche Hilfe bei jeglichen molekularbiologischen Themen.

Bei Bettina möchte ich mich für ihr jederzeit offenes Ohr bedanken. Deine Kuchenkreationen bleiben unvergessen und unerreicht. Vielen Dank an Dr. Szymon Szafranski für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Mikrobiomanalyse.

Besonderen Dank schulde ich Zhiluo für die bioinformatische Vorbereitung meiner Daten. In dem gleichen Atemzug muss auch Michael Jarek und Dr. Sabin Bhuju gedankt werden, die stets dankbare Helfer bei der Sequenzierung aller Proben waren. Ebenfalls möchte ich hiermit dem gesamten Team der Genomanalytik am HZI danken. Gleiches gilt für Prof. Dr. Dietmar Pieper und Marius Vital, sowie Iris Plumeyer und Silke Kahl aus der Arbeitsgruppe MIPI.

Vielen Dank an alle Arbeitskollegen des A-Gebäudes für die angenehme Atmosphäre. Danke an Cori für so manch unterhaltsame, aber auch nachdenkliche Gespräche.

Mein tiefer Dank gilt meinem Bruder, meinem Vater, meiner Mutter und Thomas. Sie haben mir meine Ausbildung ermöglicht und immer an mich geglaubt und mich in fachlichen Fragen unterstützt wo es nur ging. Nicht zuletzt standen sie mir in guten wie in schlechten Zeiten stets zur Seite. Danke an Donald für jede verrückte und amüsante Aktion, die stets zur Erheiterung aller führte.

Der Schluss gebührt nochmals Kristin. Ohne dich wäre die Welt um ein vielfaches ärmer. Es ist einfach nur schön, dass es Dich gibt!!!

8 Anhang

Im Anhang auf der mitgegebenen CD enthalten sind:

OTU-Listen der einzelnen Projekte/Studien

Zuordnung der klinischen Proben

Zahndaten der Stadt Braunschweig (2009-2014)

Sozialdaten der Stadt Braunschweig (2012)

Anhang 1: Studiendokumente der KraKi-Studie

Anhang 2: Studienprotokoll Klinische Proben

Anhang 3: Manuskript „Sociodemographic determinants of spatial disparities in early childhood caries – an ecological analysis in Braunschweig, Germany“

Studienprotokoll

KraKi – Eine Studie zur Vorbeugung von InfektionsKrankheiten bei Kindern

Die Auswirkungen von Präventionsmaßnahmen im Haushalt sowie in Kindertagesstätten bezogen auf das Auftreten und die Übertragung von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen und den Kariesbefall der Milchzähne bei Kindern.

Braunschweig, den 08. September 2014

Verantwortlich:

Univ.-Prof. Dr. med. Rafael Mikolajczyk, MSc: Studienleiter

Univ.- Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler: Studienleiterin Zahn- und Mundhygiene Modul

Kristin Maria Schlinkmann, MSc: Rekrutierung, Datenerhebung, Dateneingabe und –analyse

Frederic Meyer, MSc: Zahn- und Mundhygiene Modul

Weitere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Epidemiologische und Statistische Methoden (ESME)

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Abteilung für Epidemiologie, Arbeitsgruppe Epidemiologische und Statistische Methoden, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig

Inhalt

| | |
|--|-----------|
| Tabellenverzeichnis | 3 |
| Abbildungsverzeichnis | 3 |
| 1 Zielsetzung und Begründung der Studie | 4 |
| 2 Studienpopulation | 5 |
| 2.1 Fallzahlkalkulation | 6 |
| 2.1.1 Modul I Übertragung | 7 |
| 2.1.2 Modul II Zahn..... | 7 |
| 2.2 Einschlusskriterien..... | 8 |
| 2.2.1 Hauptgruppe | 8 |
| 2.2.2 Modul Übertragung..... | 8 |
| 2.2.3 Modul Zahn | 8 |
| 2.3 Ausschlusskriterien..... | 8 |
| 2.4 Rekrutierung..... | 8 |
| 3 Studientyp | 9 |
| 4 Messungen, Befunde und Beobachtungen | 9 |
| 4.2 Eltern | 9 |
| 4.2.1 Hauptgruppe | 9 |
| 4.2.2 Modul I Übertragung..... | 9 |
| 4.2.3 Modul II Zahn..... | 10 |
| 4.1 Kita..... | 10 |
| 5 Ausführliche Beschreibung des Studienablaufs/Methodik | 10 |
| 5.1 Kita..... | 11 |
| 5.2 Eltern | 11 |
| 6 Zielgrößen | 13 |
| 7 Datenerfassung und Dokumentation - Datenschutz | 14 |
| 8 Unerwünschte Ereignisse | 15 |
| 9 Auswertung/Biometrie | 16 |
| 10 Änderungen des Protokolls | 16 |
| 11 Ethikkommission..... | 16 |
| 12 Veröffentlichungsklausel..... | 16 |
| Literatur..... | 17 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Power für den Nachweis eines Effektes ($p < 0,05$) bei unterschiedlicher Effektstärke* | 6 |
| Tabelle 2: Power für den Nachweis des Unterschiedes in der Zusammensetzung der Mikrobiota (Anteil einer Spezies) zwischen der exponierten (25%) und der nicht exponierten Gruppe (75%)* | 8 |
| Tabelle 3: Erhebungsinstrumente im Studienverlauf..... | 11 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Studienablauf im Hinblick auf die Befragung der Eltern..... | 12 |
| Abbildung 2: Studienablauf im Hinblick auf die Befragung der KitaleiterInnen | 13 |

Anlage 1: Probandeninformation

Anlage 2: Einverständniserklärung

Anlage 3: Eingesetzte Fragebögen

Anlage 4: Symptomtagebuch

Anlage 5: Schreiben zur Kooperationsbereitschaft des Gesundheitsamtes

1 Zielsetzung und Begründung der Studie

Das Thema der Studie sind Infektionen und deren Prävention bei Kleinkindern und Vorschulkindern. Im Hinblick auf die Infektionsprävention sollen dabei sowohl die häusliche Umgebung als auch die Kindertagesstätten untersucht werden.

Der Anteil der Kinder, die Kindertagesstätten besuchen, ist in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. So ist die Betreuungsquote der unter 3-jährigen Kinder im Jahr 2012 auf 27,6 Prozent angestiegen. Bei den 3- bis 5-jährigen Kindern ist sie im gleichen Jahr auf 93,4 % angestiegen¹. Die ersten Jahre in der Kinderbetreuung zeichnen sich durch eine hohe Exposition aus und gehen mit einer besonders hohen Erkrankungshäufigkeit einher²⁻⁴.

Präventionsmaßnahmen zur Verhinderung von Infektionen basieren überwiegend auf der Vermeidung der Übertragung durch Hygienepraktiken bzw. Minderung der Exposition; denkbar sind aber auch Ansätze zur Stärkung der Immunabwehr. Die häufigsten Infektionserkrankungen im Kindesalter stellen gastrointestinale und respiratorische Erkrankungen dar^{5,6}. Demensprechend sind die Maßnahmen auf die Prävention dieser Erkrankungen ausgerichtet. Die geplante Untersuchung bezieht sich auf die beiden Settings *Kindertagesstätte* und *Haushalt*, denn dort finden die meisten Infektionen und Übertragungen von Infektionserkrankungen bei Kindern statt^{5,7}. In Bezug auf die Kindertagesstätten sollen auch die infrastrukturellen Gegebenheiten mit berücksichtigt werden, die das Auftreten von Infektionskrankheiten grundlegend beeinflussen können. Hierzu zählen die Gesamtfläche im Innenraum sowie des Außengeländes, die Gruppengröße sowie die räumliche Gestaltung⁸.

Es existiert ein Rahmenhygieneplan für Kindereinrichtungen in Niedersachsen und konkret für Braunschweig ein Hygieneplan für den Verbund der Braunschweiger Kinderhäuser⁹. Beide Dokumente begründen sich auf das Infektionsschutzgesetz, dass im Jahr 2001 in Kraft getreten ist¹⁰. Nach §36 dieses Gesetzes sind Gemeinschaftseinrichtungen dazu verpflichtet, die innerbetrieblichen Verfahrensweisen zu Infektionshygiene festzulegen, können diese aber nach eigenem Ermessen gestalten¹¹. Die Ausgestaltung stellt eine Quelle der Variation dar, die sich auch im Übertragungspotential der Infektionen abbilden kann. Weiterhin sind darin auch keine Präventionsmaßnahmen aufgeführt, die über die Hygiene hinausgehen.

Auf der anderen Seite kann die Übertragung von Infektionen auch in der häuslichen Umgebung stattfinden. 53 Prozent der epidemiologisch relevanten Ausbrüche von Infektionskrankheiten werden im häuslichen Umfeld hervorgerufen⁷. Gerade die Übertragung von Infektionen innerhalb der Familien führt zu einer Steigerung der Krankheitslast. Um die Übertragung innerhalb der Familien besser zu untersuchen, ist es notwendig prospektive Studien durchzuführen, die auch optimaler Weise einen Nachweis des Krankheitserregers beinhalten⁶.

Das Zusammenspiel beider Settings – Kinderbetreuung und Haushalt – stellt die Schwierigkeit in der Bestimmung der Effektivität der Präventionsmaßnahmen dar. Zwar sind bestimmte Hygienemaßnahmen positiv auf ihre Effektivität getestet worden (Handhygiene, Gesichtsmasken etc.) (vgl. z.B.: Zomer et al. 2013⁵ und Suess et al. 2012¹²), aber unklar ist, in welchem Ausmaß die Eltern davon Gebrauch machen, wie hoch ihre resultierende Effektivität unter normalen Alltagsbedingungen ist und ob andere Verhaltensweisen die ergriffenen Maßnahmen konterkarieren.

Ein weiteres Modul dieser Studie wird auch die Mundhygiene von Kindern und Kleinkindern mitberücksichtigen. Zahnkaries ist eine der häufigsten Infektionserkrankungen bei Kindern und Kleinkindern. Das Auftreten von frühkindlicher Karies der Milchzähne wird auch als „Early Childhood Caries“ (ECC) bezeichnet. In Deutschland zeigen Studien eine Karies-Prävalenz von 10 bis 15 Prozent der 0-3 jährigen Kinder (weltweit bis zu 45%)¹³. ECC kann durch mehrere Umstände begünstigt werden, etwa durch den Gebrauch von Saugflaschen, besonders aber durch die Zufuhr zuckerhaltiger Getränke. Die Komposition der Mikroorganismen ist in jedem Kariesfall als sehr komplex anzusehen und besteht nicht nur aus Bakterien (etwa *Streptococcus mutans*), sondern auch aus Pilzen wie *Candida albicans*¹⁴. Ein Zusammenhang dieser beiden Mikroorganismen konnte bereits nachgewiesen werden¹⁵. Zwar ist bekannt, dass nahezu 700 unterschiedliche Arten an Mikroorganismen den Mundraum des Menschen besiedeln, dennoch ist die Ätiologie von Karies noch immer nicht vollkommen aufgeklärt.

Die Ziele der Studie sind wie folgend zusammenzufassen:

1. Eine Beschreibung der Präventionsmaßnahmen zur Übertragung von Infektionen in den Kindertagesstätten und zu Hause.
2. Untersuchung der Assoziation dieser Maßnahmen mit dem Auftreten von Infektionen beim Kind.
3. In einem Modul wird zusätzlich die Übertragung von Infektionen in der Familie untersucht, um die Auswirkungen der Prävention unter diesem Aspekt zu untersuchen.
4. In einem weiteren Modul wird der Zusammenhang zwischen der Entstehung von Karies und der korrespondierenden Zahnmikrobiota untersucht.

2 Studienpopulation

Die Studienpopulation bilden Kleinkinder und Kinder vom nullten bis zum sechsten Lebensjahr, die in einer Kindereinrichtung in Braunschweig betreut werden. Die Teilnahme an der Studie erfolgt über die Eltern als Sorgerechtsbeauftragte^a des Kindes. Im Modul zur Übertragung der Infektionen in der

^a Auch wenn die Sorgerechtsbeauftragten des Kindes nicht die leiblichen Eltern sind, werden diese im Folgenden als Eltern bezeichnet.

Familie werden zusätzlich weitere Haushaltsmitglieder in die Studie eingeschlossen. Allerdings werden hierbei lediglich die Haushaltszusammensetzung und das Auftreten von Infektionen erfasst. In einem weiteren Modul wird zusätzlich bei 3 bis 5 jährigen Kindern ein Zahnabstrich am Anfang der Studie und ggf. 12 Monate später abgenommen.

Die Erhebung über den Einsatz von Präventionsmaßnahmen in den Kitas erfolgt durch eine Befragung der Kita-Leitungen.

2.1 Fallzahlkalkulation

Derzeit befinden sich in den 147 Kitas in Braunschweig etwa 6872 Kinder unter 6 Jahren in der Betreuung. Ausgehend von einer Teilnahmebereitschaft von 20 Prozent für die Hauptgruppe stehen für die Studie etwa 1370 Kinder zur Verfügung. Aufgrund von personellen Ressourcen möchten wir Eltern von 500 Kindern für die Studie rekrutieren. Für die deskriptiven Fragestellungen bedeutet es eine Schätzung der Prävalenz mit einem 95% Konfidenzintervall von ± 4 Prozent. Unter der Annahme einer Prävalenz des Outcome bei Nicht-Exponierten von 20 Prozent werden wir eine Power von $>0,8$ erreichen, um stärkere Risikofaktoren ($RR > 1,5$) nachzuweisen (s. Tabelle 1). Die primäre Zielstellung der Studie ist explorativ, konfirmatorische Fragestellungen werden in weiteren Studien untersucht.

Tabelle 1: Power für den Nachweis eines Effektes ($p < 0,05$) bei unterschiedlicher Effektstärke*

| Stichprobengröße | Prävalenz des Outcome bei nicht Exponierten | RR=1,3 | RR=1,5 | RR=1,8 | RR=2,0 |
|------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| 50 | 10 | 0,0171 | 0,0291 | 0,0583 | 0,0857 |
| 50 | 20 | 0,0386 | 0,0687 | 0,1496 | 0,2309 |
| 100 | 10 | 0,0336 | 0,0606 | 0,1294 | 0,1948 |
| 100 | 20 | 0,0731 | 0,1552 | 0,3545 | 0,5152 |
| 200 | 10 | 0,0682 | 0,1387 | 0,3066 | 0,4442 |
| 200 | 20 | 0,1319 | 0,3127 | 0,6638 | 0,8445 |
| 500 | 10 | 0,1477 | 0,3424 | 0,6887 | 0,8546 |
| 500 | 20 | 0,3181 | 0,6992 | 0,9748 | 0,9981 |

* Gesamtpopulation unter der Annahme einer gleicharmigen Studie, d.h. dass die exponierte und nicht-exponierte Gruppe gleich groß sind, kleinere Gesamtpopulationen approximieren eine ungleiche Gruppenverteilung

2.1.1 Modul I Übertragung

Die Untersuchung der Übertragung in den Familien erfolgt ergänzend zu der Erkrankungshäufigkeit. Angestrebt wird eine Studienpopulation von 200 Familien, die, von den an diesem Modul zur Teilnahme bereiten Familien, zufällig ausgewählt werden. Analysiert wird der Einfluss der Präventionsmaßnahmen zur Vermeidung der Übertragungsereignisse. Eine approximative Auswertung wird jeweils nur die erste Übertragung betrachten. Die Power für diese Auswertungen kann aus Tabelle 1 abgelesen werden. Zusätzlich erfolgt eine Analyse mittels eines dynamischen Modells in dem die steigende force of infection berücksichtigt wird, wenn mehrere Familienmitglieder bereits erkrankt und infektiös sind.

2.1.2 Modul II Zahn

Für dieses Modul möchten wir etwa 150 bis 200 Kinder gewinnen. Untersuchungen des Robert Koch-Instituts haben ergeben, dass etwa ein Viertel aller 3-5 Jährigen Kinder (Studiengruppe) sich zu selten die Zähne putzt. In einem Vergleich der prozentuellen Zusammensetzung der Mikrobiota des Zahns der Kinder im Hinblick auf die Dauer des Putzens stellt Tabelle 2 die Power für den Nachweis eines Unterschiedes dar. Es wird vermutet, dass bei 20 Prozent der Probanden ein signifikanter Unterschied mindestens einer Art, oder zumindest einer Bakterienfamilie festgestellt werden kann. Beträgt der Unterschied in der Abundanz dieser Art (oder Familie) <15 Prozent, so ist selbst eine Studienpopulation von 180 Probanden nicht ausreichend. Da bereits Studien vorhanden sind, die einen Anstieg in der Abundanz anzeigen¹⁶, kann aber hier davon ausgegangen werden, größere Werte als 15 Prozent zu erreichen. Bei einem Unterschied von 30 Prozent einer Art zwischen gesunden und kariösen Probanden kann eine Power von 0,8451 bei einer Stichprobengröße von 120 erreicht werden.

Tabelle 2: Power für den Nachweis des Unterschiedes in der Zusammensetzung der Mikrobiota (Anteil einer Spezies) zwischen der exponierten (25%) und der nicht exponierten Gruppe (75%)*

| Stichprobengröße | Exponiert | Nicht Exponiert | 15% | 20% | 25% | 30% |
|------------------|-----------|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| 60 | 15 | 45 | 0,1747 | 0,2781 | 0,4011 | 0,5329 |
| 120 | 30 | 90 | 0,3372 | 0,5269 | 0,7066 | 0,8451 |
| 180 | 45 | 135 | 0,4578 | 0,6859 | 0,8556 | 0,9494 |

* Bei einem Anteil von 20% in der nicht exponierten Gruppe

2.2 Einschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien gelten für eine Studienteilnahme.

2.2.1 Hauptgruppe

- Kleinkinder bis zum sechsten Lebensjahr, die eine Kindertagesstätte in Braunschweig besuchen.

2.2.2 Modul Übertragung

- Kleinkinder bis zum sechsten Lebensjahr, die eine Kindertagesstätte in Braunschweig besuchen.
- Alle Haushaltsmitglieder, die mit dem teilnehmenden Kind im gleichen Haushalt wohnen.

2.2.3 Modul Zahn

- Kleinkinder, die zum Anfang der Studie zwischen drei und fünf Jahre alt sind und eine Kindertagesstätte in Braunschweig besuchen.

2.3 Ausschlusskriterien

- Unzureichende Kenntnisse der deutschen Sprache bei den Eltern.
- Minderjährige Eltern.

2.4 Rekrutierung

Die Rekrutierung erfolgt durch Mitarbeiter der Abteilung für Epidemiologie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung. Geplant ist zunächst eine Kontaktaufnahme mit den Kindertagesstätten in Braunschweig per Brief, telefonisch und durch den Besuch der Einrichtungen, zum einen mit dem Ziel die Kita-Leitungen zu einer Teilnahme zu motivieren und zum anderen, um durch die Kitas die Kinder

rekrutieren zu können. Sofern die Kitas einverstanden sind, ist eine Vorstellung der Studie den Eltern während sie die Kinder aus der Kita abholen, geplant. Alternativ können Studienmaterialien durch die Kitas an die Eltern ausgeteilt werden.

3 Studientyp

Als Studiendesign ist eine prospektive Kohortenstudie vorgesehen.

4 Messungen, Befunde und Beobachtungen

Die Art der Datenerhebung und die eingesetzten Instrumente werden in diesem Abschnitt getrennt nach den Haushalten und den Kindertagesstätten dargestellt.

4.2 Eltern

Alle Eltern erhalten zu Beginn der Studie einen Fragebogen, der sozioökonomischen Faktoren und Risikofaktoren für das Auftreten von respiratorischen oder gastrointestinalen Erkrankungen bei den Kindern sowie die Präventionsmaßnahmen, die von den Eltern ergriffen werden, um Infektionen und deren Übertragung vorzubeugen, abfragt.

4.2.1 Hauptgruppe

In der Hauptgruppe werden neben dem oben genannten Fragebogen noch zweimonatlich Fragebögen an die Eltern versandt, die die Art und Häufigkeit der Infektionen des Kindes und weiterer Haushaltsmitglieder retrospektiv abfragen.

Entwürfe für die entsprechenden Fragebögen finden sich im Anhang.

4.2.2 Modul I Übertragung

In diesem Modul wird auch der Fragebogen zu den Präventionsmaßnahmen ausgefüllt. Die Erfassung der Infektionshäufigkeit erfolgt prospektiv über ein Symptomtagebuch über eine Dauer von vier Monaten. Durch die Eltern ist täglich das Auftreten von Symptomen für eine Erkältungskrankheit oder Magen-Darm-Erkrankung zu vermerken (für alle Haushaltsmitglieder). Das eingesetzte Symptomtagebuch basiert auf validierten Instrumenten, welche für die Zielgruppe angepasst wurden (Symptomtagebuch nach Lambert^{17,18} und Kusel^{19,20}, Canadian Acute Respiratory Illness and Flu Scale, CARIFS^{21,22}).

Weiterhin sollen Nasenabstriche der Kinder und der anderen Haushaltsmitglieder im Falle einer respiratorischen Erkrankung genommen werden. Die Abstriche werden jeweils am ersten Tag mit Krankheitsanzeichen entnommen. Dies dient zur Überprüfung, ob die betroffenen Personen an dem gleichen Krankheitserreger erkrankt sind.

Entwürfe für die benötigten Dokumente und Materialien finden sich im Anhang.

Falls in einem Nasenabstrich ein nach Infektionsschutzgesetz § 7 meldepflichtiger Erreger nachgewiesen wird, muss entsprechend den gesetzlichen Vorgaben dieser Nachweis der zuständigen Gesundheitsbehörde gemeldet werden.

4.2.3 Modul II Zahn

In diesem Modul erfolgt sowohl eine Abfrage über Ess- und Zahnputzgewohnheiten, sowie weiterer möglicher Kriterien, die Einfluss auf die Mund- und Zahnhygiene haben können, als auch eine Probenentnahme unter Zuhilfenahme eines Probenentnahmestäbchens durch Zahnärzte des Gesundheitsamtes in Braunschweig. Hierbei sollen, im Rahmen der jährlichen Routineuntersuchung in den Betreuungseinrichtungen (Kitas) der Stadt, Abstriche von den Frontschneidezähnen des Oberkiefers bei erkrankten Kindern und bei nicht erkrankten Kindern entnommen werden. Bei allen Kindern, bei denen ein Zahnabstrich genommen wurde, soll nach einem Jahr ein erneuter Abstrich genommen werden, um eine mögliche Veränderung der Mundflora sowie des Kariesstatus erfassen zu können.

Entwürfe für die entsprechenden Fragebögen finden sich im Anhang.

4.1 Kita

Zu Beginn der Studie werden mittels Fragebogen die Präventionsmaßnahmen, die in der Kita praktiziert werden, abgefragt. Ein Entwurf des entsprechenden Fragebogens findet sich im Anhang. Im Studienverlauf sollen dann die Fehlzeiten der Kinder durch die BetreuerInnen erfasst und dokumentiert werden. Sofern dies nicht praktikabel ist, sollen die Fragebögen zur Prävention dennoch ausgefüllt werden, um die entsprechenden Maßnahmen der Kitas in die Analyse zur Infektionshäufigkeit der Kinder miteinzubeziehen.

5 Ausführliche Beschreibung des Studienablaufs/Methodik

Für die hier vorgestellte Studie ist insgesamt ein Zeitraum von 18 Monaten vorgesehen. Als Start der Studie gilt die Erteilung des Ethikvotums. In der Studienzeit erfolgt die Kontaktaufnahme mit den Kindertagesstätten und den Eltern, die Rekrutierung der Eltern sowie die Durchführung und Auswertung der Studie. Die Hauptphase beginnt im November 2014 und dauert 4 Monate (vgl. Tabelle 3 sowie Abbildung 1 und 2).

Tabelle 3: Erhebungsinstrumente im Studienverlauf

| Erhebungsinstrument | Zeitpunkt der Erhebung | Teilnehmer an Erhebung |
|--|--|---|
| Fragebogen zu personenbezogenen Daten/ Einrichtungenbezogenen Daten | Einmalig nach Studienein-schluss | <ul style="list-style-type: none"> • Eltern • EinrichtungsleiterInnen der Kitas |
| Fragebogen zur Prävention und zu soziodemographischen Daten (inkl. Risikofaktoren) | Einmalig nach Studienein-schluss | Eltern |
| Fragebogen zur Prävention in den Kitas | Einmalig nach Studienein-schluss | EinrichtungsleiterInnen Kita |
| Fragebogen zur Infektionen | Zweimonatlich <ul style="list-style-type: none"> • Monat 2 • Monat 4 | Eltern in der Hauptgruppe |
| Symptomtagebuch | Fortlaufend über Studienzeit-raum (4 Monate) | Eltern im Modul zur Übertragung |
| Nasenabstrich im Infektionsfall | Je nach Auftreten von respira-torischen Infektionen | Eltern im Modul zur Übertragung sowie alle Haushaltsmitglieder des teilnehmenden Kindes |
| Fragebogen zur Mundhygiene | Einmalig nach Studienein-schluss | Eltern mit einem Kind im Alter zwischen 3 und 5 Jahren |
| Zahnabstrich | Einmalig im Studienzeitraum im Rahmen der Vorsorgeun-tersuchung des Gesundheits-amtes; eine weitere Untersu-chung nach einem Jahr ist vorgesehen | Eltern im Modul zur Zahngesund-heit |
| Dokumentation der Fehltage der Kinder | Fortlaufend über Studienzeit-raum (4 Monate) | EinrichtungsleiterInnen der Kitas |

5.1 Kita

Die Kontaktaufnahme mit den Kindertagesstätten erfolgt per Brief, telefonisch und durch den Besuch der Einrichtungen. Den EinrichtungsleiterInnen werden über Poster, Broschüren und Vorträge der Inhalt und die Zielsetzung der Studie erläutert. Eine Nachfrage seitens des Forscherteams ist zusätz-lich vorgesehen. Zur Rekrutierung gehören die Aufklärung über die Ziele und den Ablauf der Studie, die Einholung der Einverständniserklärung der Kitas, sowie die genaue Instruktion über die geplanten Maßnahmen.

5.2 Eltern

Die Rekrutierung der Eltern erfolgt in Kindertagesstätten. Den Eltern wird über Poster, Broschüren und Vorträge bei Elternabenden (je nach Einwilligung der EinrichtungsleiterInnen) Inhalt und Zielset-zung der Studie erläutert. Interessierte Eltern werden gebeten sich über eine vorfrankierte Postkarte,

die in dem Flyer zur Studie integriert ist, mit dem Studienteam in Verbindung zu setzen. Darüber hinaus ist geplant, die Eltern persönlich in den Kitas anzusprechen und für die Teilnahme zu begeistern. Eine Nachfrage seitens des Forscherteams ist zusätzlich vorgesehen. Zur Rekrutierung gehören die Aufklärung über die Ziele und den Ablauf der Studie, die Einholung der Einverständniserklärung der Eltern, sowie die genaue Instruktion über die geplanten Maßnahmen.

Zu Beginn der Hauptphase ist von den Eltern ein Fragebogen zu soziodemographischen Daten und Präventionspraktiken auszufüllen. Außerdem werden die Eltern von Kindern im Alter zwischen 3 und 5 Jahren gebeten einen weiteren Fragebogen zur Mund- und Zahnhygiene auszufüllen.

Die Hauptgruppe bekommt jeden zweiten Monat einen Fragebogen per Post zugeschickt, indem sie zur Infektionen innerhalb der Familie (des Haushaltes) befragt wird.

Die Untergruppe im Modul I füllt täglich über einen Zeitraum von vier Monaten ein Symptomtagebuch aus und entnimmt Nasenabstriche im Falle einer respiratorischen Infektion.

Bei den Teilnehmern des Moduls II werden einmalig Proben (Zahnabstrich) von Zahnärzten entnommen, die seitens des Gesundheitsamtes die Zahnuntersuchungen aller Kinder in der Braunschweiger Kitas durchführen. Eine Erklärung zur Kooperationsbereitschaft ist im Anhang beigefügt. Die Abstriche werden mit einem Wattestäbchen entnommen und unter Berücksichtigung der Zahnpflegegewohnheiten und weiterer Kriterien soll die mikrobielle Komposition näher beleuchtet werden. Es ist geplant eine weitere Probenentnahme nach einem Jahr abzunehmen.

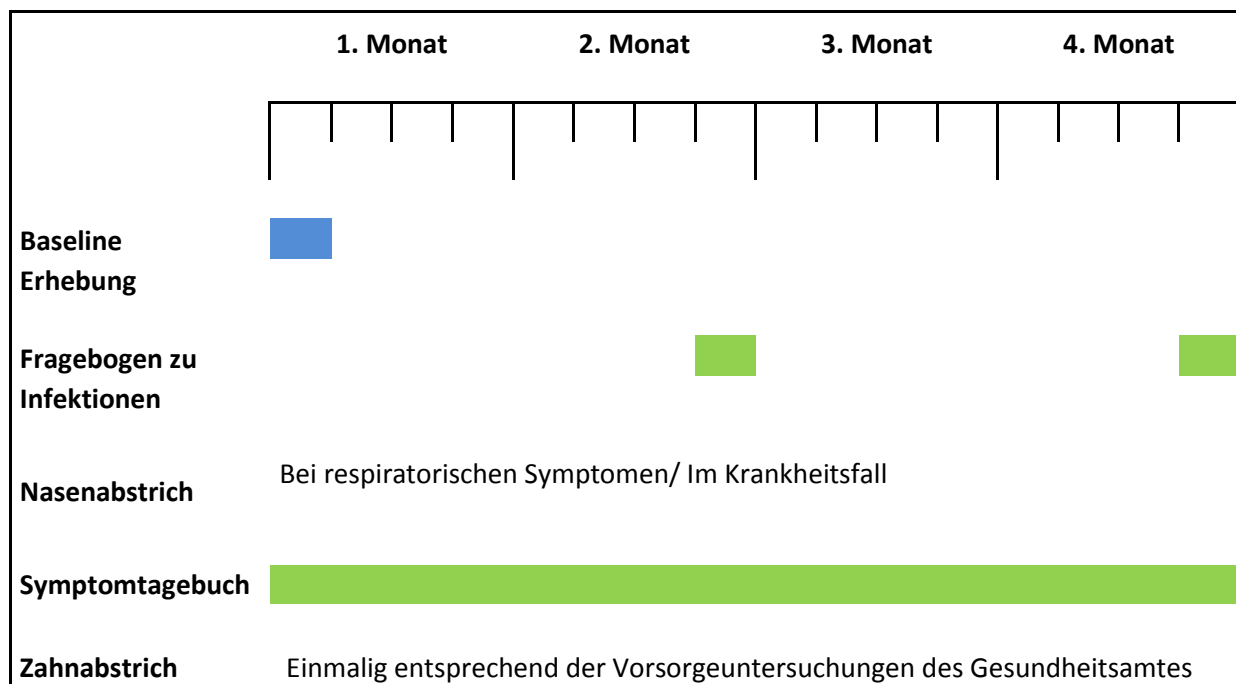


Abbildung 1: Studienablauf im Hinblick auf die Befragung der Eltern

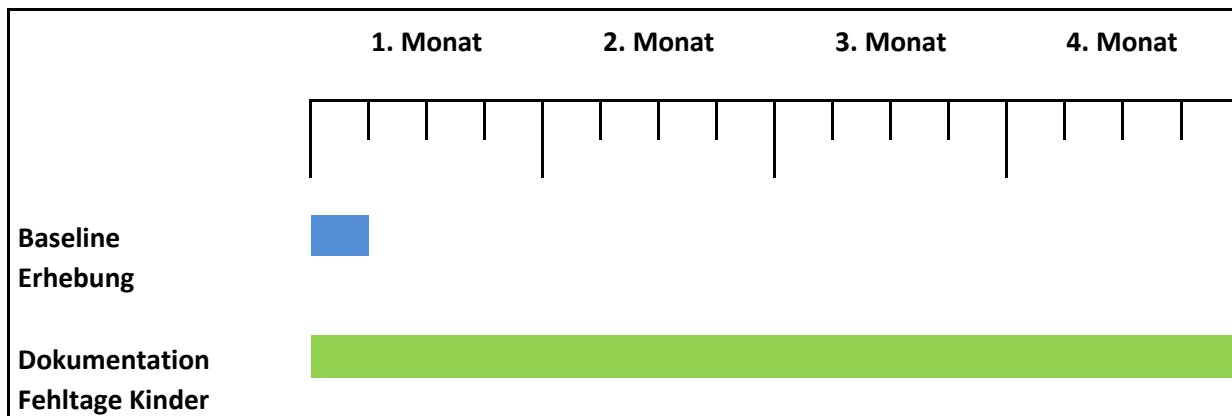


Abbildung 2: Studienablauf im Hinblick auf die Befragung der KitaleiterInnen

6 Zielgrößen

Hauptfragestellung:

Haben Präventionsmaßnahmen im Haushalt sowie in Kindertagesstätten Auswirkungen auf das Auftreten von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen bei Kindern?

Unterfragestellung 1/ Prüfziel 1: Kita – Prävention

Welche Präventionsmaßnahmen werden von Kindertagesstätten (in Braunschweig) angewandt, um das Auftreten und die Übertragung von Infektionskrankheiten zu verhindern?

Zielgröße

➔ Deskriptive Darstellung der angewandten Präventionsmaßnahmen

Unterfragestellung 2/ Prüfziel 2: Haushalt – Prävention

Welche Präventionsmaßnahmen werden von Eltern angewandt, um das Auftreten und die Übertragung von Infektionskrankheiten zu verhindern?

Zielgröße

➔ Deskriptive Darstellung der angewandten Präventionsmaßnahmen

Unterfragestellung 3/ Prüfziel 3: Haushalt–Übertragung & Prävention

Haben die Präventionsmaßnahmen aus Unterfragestellung 1 und 2 einen Einfluss auf das Auftreten von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen?

Zielgröße

- ➔ Präventionsmaßnahmen im Vergleich zur Infektionshäufigkeit
 - **Inzidenz der Infektionen** als Indikator für Effektivität der Präventionsmaßnahmen

- Effektivität in der Verhinderung von Infektionen (gastrointestinal und respiratorisch)

Unterfragestellung 4/ Prüfziel 4: Haushalt – Übertragung der Infektionen im Haushalt

Wie ist die Übertragung von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen innerhalb eines Haushaltes?

- Häufigkeit der Übertragungen an weitere Haushaltsmitglieder

Zielgrößen

- ➔ Erkrankungsdaten von Kindern und anderen Haushaltsmitgliedern
- ➔ Häufigkeit der Übertragung von Infektionserkrankungen

Unterfragestellung 5/ Prüfziel 5: Karies und Zahnmikrobiota

Wie steht die bakterielle Zusammensetzung auf den Zähnen mit dem Vorkommen von Karies in Zusammenhang?

- Mundhygiene
- Zusammensetzung der Mikrobiota
- Unterschiede in der Mikrobiota bei Karies- und nicht-Karies Trägern

Zielgrößen

- ➔ Karies (ja/nein) und die jeweils damit assoziierten Mikroorganismen/Veränderungen bei der Zusammensetzung.

7 Datenerfassung und Dokumentation - Datenschutz

Die Datenerfassung erfolgt pseudonymisiert. Die zur Identifizierung einer bestimmten Person geeigneten Daten (Name, Anschrift, Geburtsdatum, Handynummer) werden durch ein Pseudonym (eine Identifikationsnummer - ID) ersetzt, welches dem Probanden nach Einschluss in die Studie zugewiesen wird. Die Pseudonymisierung wird mittels einer gängigen Pseudonymisierungssoftware durchgeführt. Die personenbezogenen Daten werden nur in elektronischer Form auf einem passwortgeschützten Server ohne Internetverbindung aufbewahrt. Die Zugangsdaten zum Rechner sind nur dem Studienpersonal bekannt.

Die Erhebungsinstrumente enthalten keine personenidentifizierenden Angaben. Alle Erhebungsinstrumente (Fragebögen, Symptومتagebücher, Nasenabstriche, Zahnabstriche) werden mit der ID versehen versendet. Die Eltern werden in der Probandeninformation ausdrücklich darauf hingewiesen, keine Namen auf die Fragebögen und Bioproben zu schreiben. Die eigentlichen Studiendaten

(Daten aus Fragebögen, Symptomtagebüchern und Laboruntersuchungen) werden getrennt von den personenbezogenen Daten gespeichert. So kann der Datensatz ohne Kenntnis der außerhalb des Datensatzes gespeicherten Zuordnung nicht einer bestimmten Person zugeordnet werden. Somit ist die frühzeitige Trennung der personenbezogenen Daten von den Studiendaten gewährleistet. Durch die Verwendung von Thin Clients® ist der gleichzeitige Zugriff auf den passwortgeschützten Server (personenbezogene Daten) und den Server mit den Studiendaten nicht möglich.

Die pseudonymisierten Original-Fragebögen werden in einem abschließbaren Schrank im Archiv der Abteilung Epidemiologie aufbewahrt. Der Zugang zu den Räumen ist nur Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möglich, der Zugang zum Schrank nur Mitarbeitern, die an der Studie direkt beteiligt sind. Die nasalen Abstriche und Zahnabstriche werden bis zur Analyse im gefrorenen Zustand (-70°C) in Gefrierschränken der Laboratorien der Abteilung für Epidemiologie aufbewahrt. Der Zugang zu diesen Räumlichkeiten ist Unbefugten untersagt. Als zusätzliche Sicherheitsstufe dient, dass der Zugang zum HZI-Gelände gesichert und Unbefugten nicht möglich ist. Im Fall der Analyse durch interne oder externe Kooperationspartner erfolgt die Weitergabe unter Wahrung des Datenschutzes nur unter Angabe der Identifikationsnummer.

Die personenidentifizierenden Daten werden nach dem Abschluss der Studie vernichtet. Die Proben (Nasenabstriche), Symptomtagebücher und Fragebogendaten werden weiterhin aufbewahrt. Eine Weitergabe der Proben an interne oder externe Kooperationspartner zu wissenschaftlichen Zwecken kann entsprechend der Probandeneinwilligung erfolgen. Die Teilnehmer können zu jedem Zeitpunkt der Studie die sofortige Löschung jeglicher Daten oder die Vernichtung von Proben verlangen. Nach Studienabschluss und Vernichtung der personenidentifizierenden Daten ist die Vernichtung von Proben oder Studiendaten nicht mehr möglich. Die Teilnehmer werden über den genauen Zeitpunkt des Studienabschlusses aufgeklärt. Elektronische Dateien werden nur auf passwortgeschützten Rechnern oder Datenträgern aufbewahrt und bearbeitet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt nur in pseudonymisierter Form. Ergebnisse der Studie werden in einem Bericht und/oder einer Publikation nur in anonymisierter Form dargestellt.

Die ausführliche Beschreibung des Datenschutzes ist im separaten Dokument beigefügt. Das Datenschutzkonzept der vorliegenden Studie wird parallel dem Datenschutzbeauftragten des HZI (Harald Ohrdorf) und dem Bundesdatenschutzbeauftragten vorgelegt.

8 Unerwünschte Ereignisse

Im Rahmen der vorliegenden Studie ist nicht vom Auftreten unerwünschter Ereignisse auszugehen. Die Teilnehmer werden dennoch im Vorfeld darauf hingewiesen, dass bei Auftreten von Problemen

während der Probenentnahmen jederzeit ein Abbruch der Entnahme und/oder eine Kontaktaufnahme mit dem Studienpersonal erfolgen müssen. Die Ethikkommission wird beim Eintreten eines unerwünschten Ereignisses unverzüglich unterrichtet.

9 Auswertung/Biometrie

Es wird eine deskriptive Auswertung der angewandten Präventionspraktiken sowohl der Kindertagesstätten als auch der Eltern erfolgen. Die Assoziation zwischen Präventionsmaßnahmen und Infektionen wird über eine multivariable Poissonregression untersucht. Die Beschreibung der Übertragung von Infektionen in den Haushalten wird aufgrund der wechselnden Force of infection mittels dynamischer bzw. autoregressiver Modelle untersucht.

In Bezug auf die Untersuchung des Mikrobioms im Rahmen des zweiten Moduls werden die erhaltenen Gensequenzen der 16S rDNA aus den Zahnabstrichen mit Hilfe von Onlinedatenbanken untersucht. Die 16S rDNA dient dem Nachweis von Bakterien. Der sozioökonomische und demographische Hintergrund der Probanden kann somit im Zusammenhang mit der Mikrobiota betrachtet werden. Die Validierung der gefundenen Gensequenzen wird mit Varianzanalysen (ANOVA und MANOVA) durchgeführt. Ebenso wird eine principal component analysis (PCO) durchgeführt, um die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Proben, bezogen auf die Komposition der Mikroorganismen, darzustellen.

10 Änderungen des Protokolls

Änderungen im Studienprotokoll (Amendment) werden bei der Ethikkommission vorgelegt und gegebenenfalls einer erneuten Begutachtung unterzogen.

11 Ethikkommission

Die Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover zur Prüfung vorgelegt und als unbedenklich eingeschätzt.

12 Veröffentlichungsklausel

Die Veröffentlichung unterliegt keinen Beschränkungen.

Literatur

1. destatis - Statistisches Bundesamt. Kindertagesbetreuung in Deutschland 2012. https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressekonferenzen/2012/kindertagesbetreuung/begleitmaterial_PDF.pdf?__blob=publicationFile Accessed 23.05.2014.
2. Bradley RH, National Institute of Child H, Human Development Early Child Care Research N. Child care and common communicable illnesses in children aged 37 to 54 months. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003;**157**(2):196-200.
3. National Institute of Child H, Human Development Early Child Care Research N. Child care and common communicable illnesses: results from the National Institute of Child Health and Human Development Study of Early Child Care. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2001;**155**(4):481-8.
4. Zutavern A, Rzehak P, Brockow I, Schaaf B, Bollrath C, von Berg A, Link E, Kraemer U, Borte M, Herbarth O, Wichmann HE, Heinrich J, Group LS. Day care in relation to respiratory-tract and gastrointestinal infections in a German birth cohort study. *Acta Paediatr* 2007;**96**(10):1494-9.
5. Zomer TP, Erasmus V, Vlaar N, van Beeck EF, Tjon ATA, Richardus JH, Voeten HA. A hand hygiene intervention to decrease infections among children attending day care centers: design of a cluster randomized controlled trial. *BMC Infect Dis* 2013;**13**:259.
6. Sacri AS, De Serres G, Quach C, Boulianne N, Valiquette L, Skowronski DM. Transmission of acute gastroenteritis and respiratory illness from children to parents. *Pediatr Infect Dis J* 2014;**33**(6):583-8.
7. Exner M, Gebel J, Heudorf U, Ilschner C, Vogt A, Simon A. Hygiene-Tipps für's kranke Kind zu Hause. 2009.
8. Heinrich J, Koletzko B. Kindergesundheit und Kinderbetreuung bei unter 3-Jährigen. *Monatsschr Kinderheilkd* 2008;**6**(156):562-568.
9. Verbund Braunschweiger Kinderhäuser (VBK). Hygieneplan für den Verbund Braunschweiger Kinderhäuser. 2012.
10. Verbraucherschutz; BdJuf. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG). 2001.
11. Niedersächsisches Landesgesundheitsamt FldLN. Rahmen-Hygieneplan gemäß § 36 Infektionsschutzgesetz für Kindereinrichtungen (Kinderkrippen, -gärten, -tagesstätten, auch integrativ und Kinderhorte). 2002.
12. Suess T, Remschmidt C, Schink SB, Schweiger B, Nitsche A, Schroeder K, Doellinger J, Milde J, Haas W, Koehler I, Krause G, Buchholz U. The role of facemasks and hand hygiene in the prevention of influenza transmission in households: results from a cluster randomised trial; Berlin, Germany, 2009-2011. *BMC Infect Dis* 2012;**12**:26.
13. Bundeszahnärztekammer KB. Frühkindliche Karies vermeiden - Ein Konzept zur zahnmedizinischen Prävention bei Kleinkindern. 2014.
14. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res* 2010;**44**(3):272-6.
15. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, Wagner-Dobler I. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J* 2014.

16. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, Asnani K, Griffen AL. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol* 2010;**48**(11):4121-8.
17. Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, Carapetis JR, Sloots TP, Nissen MD, Nolan TM. Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics* 2007;**120**(4):e929-37.
18. Lambert SB, Ware RS, Cook AL, Maguire FA, Whitley DM, Bialasiewicz S, Mackay IM, Wang D, Sloots TP, Nissen MD, Grimwood K. Observational Research in Childhood Infectious Diseases (ORChID): a dynamic birth cohort study. *BMJ Open* 2012;**2**(6).
19. Kusel MM, de Klerk N, Holt PG, Landau LI, Sly PD. Occurrence and management of acute respiratory illnesses in early childhood. *J Paediatr Child Health* 2007;**43**(3):139-46.
20. Kusel MM, de Klerk NH, Holt PG, Keadze T, Johnston SL, Sly PD. Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *Pediatr Infect Dis J* 2006;**25**(8):680-6.
21. Jacobs B, Young NL, Dick PT, Ipp MM, Dutkowski R, Davies HD, Langley JM, Greenberg S, Stephens D, Wang EE. Canadian Acute Respiratory Illness and Flu Scale (CARIFS): development of a valid measure for childhood respiratory infections. *J Clin Epidemiol* 2000;**53**(8):793-9.
22. Shepperd S, Perera R, Bates S, Jenkinson C, Hood K, Harnden A, Mant D. A children's acute respiratory illness scale (CARIFS) predicted functional severity and family burden. *J Clin Epidemiol* 2004;**57**(8):809-14.

KraKi – Eine Studie zur Vorbeugung von InfektionsKrankheiten bei Kindern

Datenschutzkonzept vom 08.09.2014

Verantwortlichkeiten:

Univ.-Prof. Dr. med. Rafael Mikolajczyk, MSc: Studienleiter

Univ.- Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler: Studienleiterin Zahn- und Mundhygiene Modul

Kristin Maria Schlinkmann (**KMS**), MSc: Rekrutierung, Datenerhebung, Dateneingabe und –analyse

Frederic Meyer (**FM**): Zahn- und Mundhygiene, Rekrutierung

Weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe Epidemiologische und Statistische Methoden

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Abteilung für Epidemiologie, Arbeitsgruppe

Epidemiologische und Statistische Methoden, Inhoffenstr. 7, 38124 Braunschweig

Inhalt

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Zielsetzung und Begründung der Studie | 3 |
| 2 | Zielgrößen..... | 5 |
| 3 | Zweckbestimmung und Rechtsgrundlage der Datenverarbeitung, Verpflichtung auf das Datengeheimnis | 6 |
| 4 | Rekrutierung..... | 6 |
| 5 | Pseudonymisierung | 7 |
| 6 | Erhebungsinstrumente..... | 7 |
| 6.1 | Eltern | 8 |
| 6.1.1 | 4.2.1 Hauptgruppe..... | 8 |
| 6.1.2 | Modul I Übertragung..... | 8 |
| 6.1.3 | Modul II Zahn..... | 8 |
| 6.2 | Kita..... | 9 |
| 6.3 | Erhebungsinstrumente und ID | 9 |
| 7 | IT-Struktur und Datenfluss | 9 |
| 8 | Datenverarbeitung und –auswertung..... | 10 |
| 9 | Datenschutzvorkehrungen am HZI..... | 11 |
| 10 | Fristen für die Sperrung und Löschung der personenbezogenen Daten | 13 |
| 11 | Aufbewahrungsfristen für Studiendaten..... | 14 |
| 12 | Kontrolle durch den Datenschutzbeauftragten | 15 |
| 13 | Literaturverzeichnis | 16 |
| 14 | Anlagen..... | 18 |
| | Anlage 1: Merkblatt zur Verpflichtung auf das Datengeheimnis | 18 |
| | Anlage 2: Verpflichtungserklärung auf das Datengeheimnis | 21 |
| | Anlage 3: Protokoll-Vorlage für das Löschen der personenbezogenen Daten | 23 |
| | Anlage 4: Einverständniserklärung zur Studie – Eltern | 25 |
| | Anlage 5: Einverständniserklärung zur Studie - Kita | 29 |

1 Zielsetzung und Begründung der Studie

Das Thema der Studie sind Infektionen und deren Prävention bei Kleinkindern und Vorschulkindern. Im Hinblick auf die Infektionsprävention sollen dabei sowohl die häusliche Umgebung als auch die Kindertagesstätten untersucht werden.

Der Anteil der Kinder, die Kindertagesstätten besuchen, ist in den letzten Jahren kontinuierlich angestiegen. So ist die Betreuungsquote der unter 3-jährigen Kinder im Jahr 2012 auf 27,6 Prozent angestiegen. Bei den 3- bis 5-jährigen Kindern ist sie im gleichen Jahr auf 93,4 % angestiegen¹. Die ersten Jahre in der Kinderbetreuung zeichnen sich durch eine hohe Exposition aus und gehen mit einer besonders hohen Erkrankungshäufigkeit einher²⁻⁴.

Präventionsmaßnahmen zur Verhinderung von Infektionen basieren überwiegend auf der Vermeidung der Übertragung durch Hygienepraktiken bzw. Minderung der Exposition; denkbar sind aber auch Ansätze zur Stärkung der Immunabwehr. Die häufigsten Infektionserkrankungen im Kindesalter stellen gastrointestinale und respiratorische Erkrankungen dar^{5,6}. Demensprechend sind die Maßnahmen auf die Prävention dieser Erkrankungen ausgerichtet. Die geplante Untersuchung bezieht sich auf die beiden Settings *Kindertagesstätte* und *Haushalt*, denn dort finden die meisten Infektionen und Übertragungen von Infektionserkrankungen bei Kindern statt^{5,7}. In Bezug auf die Kindertagesstätten sollen auch die infrastrukturellen Gegebenheiten mit berücksichtigt werden, die das Auftreten von Infektionskrankheiten grundlegend beeinflussen können. Hierzu zählen die Gesamtfläche im Innenraum sowie des Außengeländes, die Gruppengröße sowie die räumliche Gestaltung⁸.

Es existiert ein Rahmenhygieneplan für Kindereinrichtungen in Niedersachsen und konkret für Braunschweig ein Hygieneplan für den Verbund der Braunschweiger Kinderhäuser⁹. Beide Dokumente begründen sich auf das Infektionsschutzgesetz, dass im Jahr 2001 in Kraft getreten ist¹⁰. Nach §36 dieses Gesetzes sind Gemeinschaftseinrichtungen dazu verpflichtet, die innerbetrieblichen Verfahrensweisen zu Infektionshygiene festzulegen, können diese aber nach eigenem Ermessen gestalten¹¹. Die Ausgestaltung stellt eine Quelle der Variation dar, die sich auch im Übertragungspotential der Infektionen abbilden kann. Weiterhin sind darin auch keine Präventionsmaßnahmen aufgeführt, die über die Hygiene hinausgehen.

Auf der anderen Seite kann die Übertragung von Infektionen auch in der häuslichen Umgebung stattfinden. 53 Prozent der epidemiologisch relevanten Ausbrüche von Infektionskrankheiten werden im häuslichen Umfeld hervorgerufen⁷. Gerade die Übertragung von Infektionen innerhalb der

Familien führt zu einer Steigerung der Krankheitslast. Um die Übertragung innerhalb der Familien besser zu untersuchen, ist es notwendig prospektive Studien durchzuführen, die auch optimaler Weise einen Nachweis des Krankheitserregers beinhalten⁶.

Das Zusammenspiel beider Settings – Kinderbetreuung und Haushalt – stellt die Schwierigkeit in der Bestimmung der Effektivität der Präventionsmaßnahmen dar. Zwar sind bestimmte Hygienemaßnahmen positiv auf ihre Effektivität getestet worden (Handhygiene, Gesichtsmasken etc.) (vgl. z.B.: Zomer et al. 2013⁵ und Suess et al. 2012¹²), aber unklar ist, in welchem Ausmaß die Eltern davon Gebrauch machen, wie hoch ihre resultierende Effektivität unter normalen Alltagsbedingungen ist und ob andere Verhaltensweisen die ergriffenen Maßnahmen konterkarieren.

Ein weiteres Modul dieser Studie wird auch die Mundhygiene von Kindern und Kleinkindern mitberücksichtigen. Zahnkaries ist eine der häufigsten Infektionserkrankungen bei Kindern und Kleinkindern. Das Auftreten von frühkindlicher Karies der Milchzähne wird auch als „Early Childhood Caries“ (ECC) bezeichnet. In Deutschland zeigen Studien eine Karies-Prävalenz von 10 bis 15 Prozent der 0-3 jährigen Kinder (weltweit bis zu 45%)¹³. ECC kann durch mehrere Umstände begünstigt werden, etwa durch den Gebrauch von Saugflaschen, besonders aber durch die Zufuhr zuckerhaltiger Getränke. Die Komposition der Mikroorganismen ist in jedem Kariesfall als sehr komplex anzusehen und besteht nicht nur aus Bakterien (etwa *Streptococcus mutans*), sondern auch aus Pilzen wie *Candida albicans*¹⁴. Ein Zusammenhang dieser beiden Mikroorganismen konnte bereits nachgewiesen werden¹⁵. Zwar ist bekannt, dass nahezu 700 unterschiedliche Arten an Mikroorganismen den Mundraum des Menschen besiedeln, dennoch ist die Ätiologie von Karies noch immer nicht vollkommen aufgeklärt.

Die Ziele der Studie sind wie folgend zusammenzufassen:

- Eine Beschreibung der Präventionsmaßnahmen zur Übertragung von Infektionen in den Kindertagesstätten und zu Hause.
- Untersuchung der Assoziation dieser Maßnahmen mit dem Auftreten von Infektionen beim Kind.
- In einem Modul wird zusätzlich die Übertragung von Infektionen in der Familie untersucht, um die Auswirkungen der Prävention unter diesem Aspekt zu untersuchen.
- In einem weiteren Modul wird der Zusammenhang zwischen der Entstehung von Karies und der korrespondierenden Zahnmikrobiota untersucht.

2 Zielgrößen

Hauptfragestellung:

Haben Präventionsmaßnahmen im Haushalt sowie in Kindertagesstätten Auswirkungen auf das Auftreten von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen bei Kindern?

Unterfragestellung 1/ Prüfziel 1: Kita – Prävention

Welche Präventionsmaßnahmen werden von Kindertagesstätten (in Braunschweig) angewandt, um das Auftreten und die Übertragung von Infektionskrankheiten zu verhindern?

Zielgröße

- ➔ Deskriptive Darstellung der angewandten Präventionsmaßnahmen

Unterfragestellung 2/ Prüfziel 2: Haushalt – Prävention

Welche Präventionsmaßnahmen werden von Eltern angewandt, um das Auftreten und die Übertragung von Infektionskrankheiten zu verhindern?

Zielgröße

- ➔ Deskriptive Darstellung der angewandten Präventionsmaßnahmen

Unterfragestellung 3/ Prüfziel 3: Haushalt–Übertragung & Prävention

Haben die Präventionsmaßnahmen aus Unterfragestellung 1 und 2 einen Einfluss auf das Auftreten von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen?

Zielgröße

- ➔ Präventionsmaßnahmen im Vergleich zur Infektionshäufigkeit
 - **Inzidenz der Infektionen** als Indikator für Effektivität der Präventionsmaßnahmen
 - Effektivität in der Verhinderung von Infektionen (gastrointestinal und respiratorisch)

Unterfragestellung 4/ Prüfziel 4: Haushalt – Übertragung der Infektionen im Haushalt

Wie ist die Übertragung von gastrointestinalen und respiratorischen Infektionserkrankungen innerhalb eines Haushaltes?

- Häufigkeit der Übertragungen an weitere Haushaltsmitglieder

Zielgrößen

- ➔ Erkrankungsdaten von Kindern und anderen Haushaltsmitgliedern
- ➔ Häufigkeit der Übertragung von Infektionserkrankungen

Unterfragestellung 5/ Prüfziel 5: Karies und Zahnmikrobiota

Wie steht die bakterielle Zusammensetzung auf den Zähnen mit dem Vorkommen von Karies in Zusammenhang?

- Mundhygiene
- Zusammensetzung der Mikrobiota
- Unterschiede in der Mikrobiota bei Karies- und nicht-Karies Trägern

Zielgrößen

- ➔ Karies (ja/nein) und die jeweils damit assoziierten Mikroorganismen, sowie deren Stoffwechselprodukte

3 Zweckbestimmung und Rechtsgrundlage der Datenverarbeitung, Verpflichtung auf das Datengeheimnis

Mitarbeiter der Abteilung EPID werden zu Beginn des Dienstverhältnisses auf das Datengeheimnis (§ 5 BDSG) verpflichtet, d.h. es ist ihnen untersagt, personenbezogene Daten unbefugt zu erheben, zu verarbeiten oder zu nutzen. Das Datengeheimnis gilt auch über das Ende ihrer Tätigkeit hinaus (Anlage 1). Werden im Rahmen von Qualifizierungsarbeiten (Bachelor/Master/Praktikanten etc.) Studierende mit Arbeiten in Projekten betraut, werden sie den Mitarbeitern der Abteilung EPID bezüglich des Datenschutzes mit allen Rechten und Pflichten gleichgestellt.

Alle Mitarbeiter eines Projektes unterschreiben eine Verpflichtungserklärung auf das Datengeheimnis. Diejenigen, die in beiden Teams bzw. beiden Aufgabenbereichen (Rekrutierung und Untersuchung) arbeiten und damit auf alle Datensysteme Zugriff haben, sollten namentlich aufgeführt werden und eine zusätzliche Verpflichtungserklärung unterschreiben.

4 Rekrutierung

Die Rekrutierung erfolgt in Kindertagesstätten, die Kontaktaufnahme mit den Kindertagesstätten erfolgt per Brief, telefonisch und durch den Besuch der Einrichtungen. Den Eltern und Kitas wird über

Poster, Broschüren und Vorträgen bei Elternabenden (je nach Einwilligung der EinrichtungsleiterInnen) Inhalt und Zielsetzung der Studie erläutert. Interessierte Eltern werden gebeten sich mit dem Studienteam in Verbindung zu setzen (persönlich vor Ort, per Telefon, E-Mail, vorfrankierte Postkarte im Flyer). Geplant ist alle 147 Kitas in Braunschweig anzusprechen und etwa 500 Kinder in die Studie einzuschließen.

5 Pseudonymisierung

Die Datenerfassung erfolgt pseudonymisiert. Die zur Identifizierung einer bestimmten Person geeigneten Daten (wie Name, Anschrift, Geburtsdatum, Telefon- bzw. Handynummer) werden durch ein Pseudonym (eine Identifikationsnummer, ID) ersetzt, welches dem Probanden nach Einschluss in die Studie zugewiesen wird.

Die Generierung des Pseudonyms erfolgt mittels der Software Microsoft Excel 2010. Hierzu werden zunächst 89.999 fünfstellige Zahlen (von 10.000 bis 99.999) generiert. In einem zweiten Schritt wird jeder einzelnen fünfstelligen Zahl eine zufällige Zahl zwischen 0 und 1 zugeordnet [Befehl Zufallszahl()]. Anschließend werden die Datensätze aufsteigend nach der zufällig generierten Zahl zwischen 0 und 1 geordnet. Von den so in eine zufällige Reihenfolge gebrachten fünfstelligen Zahlen werden die IDs nach Eingang der Anmeldungen zur Studie an die Teilnehmer vergeben.

Die personenbezogenen Daten werden *nur in elektronischer Form auf einem passwortgeschützten Server ohne Internetverbindung* aufbewahrt. Die Zugangsdaten zum Rechner sind nur KMS und FM und angeleiteten Hilfskräften (Promovenden, Studenten, Absolventen eines wissenschaftlichen Jahres) bekannt.

Die eigentlichen Studiendaten (Daten aus Fragebögen und Laboruntersuchungen) werden mit der Identifikationsnummer versehen auf einem anderen Server gespeichert. So kann der Datensatz ohne Kenntnis der außerhalb des Datensatzes gespeicherten Zuordnung nicht einer bestimmten Person zugeordnet werden, somit ist die frühzeitige Trennung der personenbezogenen Daten von den Studiendaten gewährleistet. Durch die Verwendung von Thin Clients ist der gleichzeitige Zugriff auf den passwortgeschützten Server (personenbezogene Daten) und den Server mit den Studiendaten nicht möglich.

6 Erhebungsinstrumente

Die Art der Datenerhebung und die eingesetzten Instrumente werden in diesem Abschnitt getrennt nach den Haushalten und den Kindertagesstätten dargestellt.

6.1 Eltern

Alle Eltern erhalten zu Beginn der Studie einen Fragebogen, der sozioökonomischen Faktoren und Risikofaktoren für das Auftreten von respiratorischen oder gastrointestinalen Erkrankungen bei den Kindern sowie die Präventionsmaßnahmen, die von den Eltern ergriffen werden, um Infektionen und deren Übertragung vorzubeugen, abfragt. Zum Ende der Studie erhalten alle Teilnehmer noch einen Abschlussfragebogen, über den eine Rückmeldung zur Studie gegeben werden kann.

6.1.1 4.2.1 Hauptgruppe

In der Hauptgruppe werden neben dem oben genannten Fragebogen noch zweimonatlich Fragebögen an die Eltern versandt, die die Art und Häufigkeit der Infektionen des Kindes und weiterer Haushaltsmitglieder retrospektiv abfragen.

Entwürfe für die entsprechenden Fragebögen finden sich im Anhang.

6.1.2 Modul I Übertragung

In diesem Modul wird auch der Fragebogen zu den Präventionsmaßnahmen ausgefüllt. Die Erfassung der Infektionshäufigkeit erfolgt prospektiv über ein Symptومتagebuch über eine Dauer von vier Monaten. Durch die Eltern ist täglich das Auftreten von Symptomen für eine Erkältungskrankheit oder Magen-Darm-Erkrankung zu vermerken (für alle Haushaltsmitglieder). Das eingesetzte Symptومتagebuch basiert auf validierten Instrumenten, welche für die Zielgruppe angepasst wurden (Symptومتagebuch nach Lambert^{16,17} und Kusel^{18,19}, Canadian Acute Respiratory Illness and Flu Scale, CARIFS^{20,21}).

Weiterhin sollen Nasenabstriche der Kinder und der anderen Haushaltsmitglieder im Falle einer respiratorischen Erkrankung genommen werden. Die Abstriche werden jeweils am ersten Tag mit Krankheitsanzeichen entnommen. Dies dient zur Überprüfung, ob die betroffenen Personen an dem gleichen Krankheitserreger erkrankt sind.

Entwürfe für die benötigten Dokumente und Materialien finden sich im Anhang.

6.1.3 Modul II Zahn

In diesem Modul erfolgt sowohl eine Abfrage über Ess- und Zahnputzgewohnheiten, sowie weiterer möglicher Kriterien, die Einfluss auf die Mund- und Zahnhygiene haben können, als auch eine Probenentnahme unter Zuhilfenahme eines Probenentnahmestäbchens durch Zahnärzte des Gesundheitsamtes in Braunschweig. Hierbei sollen, im Rahmen der jährlichen Routineuntersuchung in den Betreuungseinrichtungen (Kitas) der Stadt, Abstriche von den Frontschneidezähnen des Oberkiefers bei erkrankten Kindern und bei nicht erkrankten Kindern entnommen werden. Bei allen

Kindern, bei denen ein Zahnabstrich genommen wurde, soll nach einem Jahr ein erneuter Abstrich genommen werden, um eine mögliche Veränderung der Mundflora sowie des Kariesstatus erfassen zu können.

Entwürfe für die entsprechenden Fragebögen finden sich im Anhang.

6.2 Kita

Zu Beginn der Studie werden mittels Fragebogen die Präventionsmaßnahmen, die in der Kita praktiziert werden, abgefragt. Ein Entwurf des entsprechenden Fragebogens findet sich im Anhang. Im Studienverlauf sollen dann die Fehlzeiten der Kinder durch die BetreuerInnen erfasst und dokumentiert werden. Sofern dies nicht praktikabel ist, sollen die Fragebögen zur Prävention dennoch ausgefüllt werden, um die entsprechenden Maßnahmen der Kitas in die Analyse zur Infektionshäufigkeit der Kinder miteinzubeziehen. Die Kinder werden hier nicht namentlich erfasst, sondern lediglich die Häufigkeit der Fehltag und der der-sofern bekannt-Grund hierfür wird notiert.

6.3 Erhebungsinstrumente und ID

Die Erhebungsinstrumente enthalten keine personenidentifizierenden Angaben. Alle Erhebungsinstrumente (Fragebögen, Symptomtagebücher, Probenbehälter) werden mit der ID versehen versendet. Die Eltern werden in der Probandeninformation ausdrücklich darauf hingewiesen, keine Namen auf die Fragebögen, Symptomtagebücher und Bioproben zu schreiben.

7 IT-Struktur und Datenfluss

Die Eingabe der Studiendaten erfolgt ausschließlich anhand der ID durch das Programm Teleform, wodurch ein Export der Daten in eine Microsoft Excel-Datenbank erfolgt. Eine Übertragung kann dann in die Statistik-Software SPSS (oder vergleichbare) erfolgen (quantitative Daten). Zur Erfassung der personenbezogenen Daten vergleiche Punkt 5 zur Pseudonymisierung. Die Eingabe erfolgt unverzüglich nach Erhalt der Fragebögen. Die Originale sind nicht frei zugänglich und können nur von dem angeleiteten Studienpersonal (KMS, FM und Mitarbeitern) eingesehen und eingegeben werden. Das Studienpersonal ist zur Verschwiegenheit verpflichtet.

Sämtliche Probeentnahmematerialien werden mit einer ID versehen versendet.

Direkt nach der Entnahme der Zahnabstriche werden die Proben eingesammelt und weggefroren. Sofern die Proben nicht durch FM persönlich eingesammelt werden, verschicken die Zahnärzte diese unverzüglich per Post. Die Untersuchung der Zahnabstriche erfolgt durch FM selber am HZI und beinhaltet die Untersuchung der Zahnmikrobiota. Von den Proben werden die Nukleinsäuren isoliert

und die 16S rDNA sequenziert. Damit ist lediglich ein Rückschluss auf die bakterielle Zusammensetzung möglich.

Die Nasenabstriche werden immer per Post von den Teilnehmern versendet. Nach dem Eintreffen der Proben in der Abteilung werden diese sofort eingefroren und anhand der ID in das Programm mySamples eingetragen. So kann nur von FM oder KMS selbst und angeleiteten Hilfskräften (Promovenden, Studenten, Absolventen eines wissenschaftlichen Jahres) eine Verbindung zu den dazugehörigen persönlichen Daten und Fragebögen hergestellt werden. Alternativ könnten die Nasenabstriche auch direkt an das Niedersächsische Landesgesundheitsamt versendet werden, um dort analysiert zu werden. Die Untersuchung der Nasenabstriche erfolgt demnach entweder im eigenen Labor oder durch interne oder externe Kooperationspartner. Sofern eine Weitergabe der Proben erforderlich ist, geschieht dies nur in pseudonymisierter Form und bei Einwilligung der Eltern. Die Proben werden auf Erkältungsviren (Influenza, RSV, Adenovirus, Picornavirus, Metapneumovirus) untersucht.

Falls in einem Nasenabstrich ein nach Infektionsschutzgesetz § 7 meldepflichtiger Erreger nachgewiesen wird, muss entsprechend den gesetzlichen Vorgaben dieser Nachweis der zuständigen Gesundheitsbehörde gemeldet werden.

Durch die Pseudonymisierung anhand einer ID sind keinerlei Rückschlüsse von anderen außer dem beteiligten Studienpersonal (KMS, FM und Mitarbeitern) möglich. Das Studienpersonal ist zur Verschwiegenheit verpflichtet. Nach Analyse der Proben und Beendigung der Studie werden alle personenidentifizierenden Daten vernichtet, sodass eine Zuordnung der Proben nicht mehr möglich ist.

8 Datenverarbeitung und -auswertung

Es wird eine deskriptive Auswertung der angewandten Präventionspraktiken sowohl der Kindertagesstätten als auch der Eltern erfolgen. Die Assoziation zwischen Präventionsmaßnahmen und Infektionen wird über eine multivariable Poissonregression untersucht. Die Beschreibung der Übertragung von Infektionen in den Haushalten wird aufgrund der wechselnden Force of infection mittels dynamischer bzw. autoregressiver Modelle untersucht.

In Bezug auf die Untersuchung der Mikrobiota im Rahmen des Zahnmoduls werden die erhaltenen Gensequenzen der 16S rDNA aus den Zahnabstrichen mit Hilfe von Onlinedatenbanken untersucht. Die 16S rDNA dient dem Nachweis von Bakterien. Der sozioökonomische und demographische Hintergrund der Probanden kann somit im Zusammenhang mit der Mikrobiota betrachtet werden.

Die Validierung der gefundenen Gensequenzen wird mit Varianzanalysen (ANOVA und MANOVA) durchgeführt. Ebenso wird eine principal coordinate analysis (PCO) durchgeführt, um die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Proben darzustellen.

9 Datenschutzvorkehrungen am HZI

Räumliche Voraussetzungen / Zutrittskontrolle

Die Räume der Abteilung für Epidemiologie befinden sich im Gebäude Y3 auf dem Gelände des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung (HZI). Der Zugang auf das Gelände ist für Mitarbeiter über mittels Transponder zu öffnende Pforten möglich. Besucher erhalten Zugang auf das Gelände erst nach Anmeldung durch die Pförtner in den jeweiligen Abteilungen. Da die Räume der Abteilung für Epidemiologie keine weitere Möglichkeit einer Zutrittskontrolle bieten, stellen die Mitarbeiter der Abteilung EPID jederzeit sicher, dass keine datenschutzrelevanten Informationen frei zugänglich sind, insbesondere zu Zeiten, zu denen Besucher vor Ort sind, die Räume gereinigt werden oder Pausen eingelegt werden.

Werden im Rahmen von Qualifizierungsarbeiten (Bachelor/Master/Praktikanten etc.) Studierende mit Arbeiten in Projekten betraut, werden sie den Mitarbeitern der Abteilung EPID bezüglich des Datenschutzes mit allen Rechten und Pflichten gleichgestellt. Sie werden auf das Datengeheimnis (§ 5 BDSG) verpflichtet, d.h. es ist ihnen untersagt, personenbezogene Daten unbefugt zu erheben, zu verarbeiten oder zu nutzen. Das Datengeheimnis gilt auch über das Ende ihrer Tätigkeit hinaus (Anlage 1).

Die Sicherung der personenidentifizierenden Daten erfolgt auf redundanten Backupsystemen im Rechenzentrum des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung in Braunschweig in abschließbaren Räumen, zu denen nur ausgewählte Personen Zutritt haben.

Zugangs- und Zugriffskontrolle

Die Abteilung für Epidemiologie ist in das allgemeine, nach außen abgeschlossene Rechnernetz des HZI (Braunschweig) eingebunden. Jegliche Datenübermittlung außerhalb dieses abgeschlossenen Netzes erfolgt ausschließlich in verschlüsselter Form nach Authentifikation beider Endstellen (Client- und Serverzertifikate).

Für Forschungsprojekte, in denen personenbezogene Daten erhoben und verarbeitet werden, gelten strenge Sicherheitsvorkehrungen zur physikalischen, logischen und organisatorischen Trennung der personenbezogenen Daten von den Auswertungsdaten. Für die Speicherung und Verarbeitung der

personenbezogenen Daten dieser Forschungsprojekte steht ein abteilungseigener, geschützter Server in einem abgeschlossenen Serverraum im Rechenzentrum, der von zwei Mitarbeitern des Rechenzentrums verwaltet wird.

Die zuständigen Ansprechpartner im Rechenzentrum sind:

Dietrich Volkov (Serveradministration, -1245) und Christoph Barlag (Sicherheit, -1224).

Der geschützte Server kann über drei Arbeitsplätze der Abteilung EPID angesprochen werden, die mit Thin Clients (mit Switch-Funktion) ausgestattet sind. Über die Switch-Funktion kann bei Bedarf die Arbeitsumgebung auf Neon verlassen und auf den geschützten Server umgeschaltet werden. Damit ist sichergestellt, dass nicht gleichzeitig auf Neon und dem geschützten Server gearbeitet werden kann.

Für jeden Nutzer wird ein persönlicher, passwort-geschütztes Account angelegt, mit dem die Anmeldung über den Thin Client erfolgt. Jeglicher Datenzugriff erfordert eine Authentifizierung mindestens mittels Nutzernamen und Passwort. Ein ungesicherter Gastzugang zum System besteht nicht. Für Passwörter gelten Richtlinien zur Komplexität und Mindestlänge. Die personenbezogenen Daten auf dem geschützten Server sind somit nicht von außerhalb, aber auch nicht innerhalb des HZI von jedem Rechner aus erreichbar. Auch ist sichergestellt, dass jeder Mitarbeiter nur auf ein Projekt zurzeit zugreifen kann. Eine Vermischung/Sammlung von personenbezogenen Daten aus mehreren Projekten ist damit ausgeschlossen.

Bei Arbeitsunterbrechungen müssen sich die Benutzer vom geschützten Server abmelden. Da der Ausgang des USB-Anschlusses des Thin Clients nicht inaktiviert werden kann, werden die jeweiligen Projektmitarbeiter ausdrücklich darüber aufgeklärt, dass keine geschützten Daten unbefugt über diesen USB-Ausgang kopiert werden dürfen. Ein entsprechender Passus ist in der zu unterschreibenden Datenschutzerklärung enthalten.

Auswertungsdaten / Anmeldung eines Ordners für Auswertungsdaten

Mit der Projektanmeldung im Rechenzentrum wird auch ein Ordner auf Neon für die pseudonymisierten Auswertungsdaten beantragt, auf den nur die Projektmitarbeiter entsprechend ihrer Rolle zugreifen können.

Drucken

Personenbezogene Ausdrücke wie Serienbriefe, Ergebnismitteilungen etc. können von den drei Arbeitsplätzen über eine geschützte Verbindung (pseudolokales Port) unter Umgehung des Spoolservers direkt auf den Netzwerkdrucker geschickt werden. Dabei ist sicherzustellen, dass die projektbezogenen Ausdrücke nicht unbeaufsichtigt am Drucker liegenbleiben. Die Projektmitarbeiter werden deshalb verpflichtet, jeden Ausdruck auf einem Bizhub-Rechner mit einem Passwort zu versehen. Der Druckauftrag wird in diesem Fall erst dann ausgelöst, wenn der Nutzer am Drucker das Passwort eingibt. Eine Anleitung hierzu ist zu finden unter T:\BizHub-C253-C353\Sicheres Drucken von Dokumenten.pdf (siehe Anlage).

Backups

Vom geschützten Server mit den personenidentifizierenden Daten der Probanden werden regelmäßig Backups über eine verschlüsselte Standleitung im Backupsystem des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung erstellt. Diese werden synchron auf ein hochverfügbares Cluster aus Storagesystemen an zwei Standorten innerhalb des Campus des HZI geschrieben. Wochentags werden davon differentielle Backups auf hochverfügbare Bandroboter an zwei Standorten innerhalb des Campus des HZI geschrieben, an den Wochenenden erfolgt ein ‚full Backup‘ ebenfalls auf die Bandroboter.

10 Fristen für die Sperrung und Löschung der personenbezogenen Daten

Die personenidentifizierenden Daten werden nach dem Abschluss der Studie vernichtet.

Elektronische Daten

Die Abteilung EPID setzt für die Löschung von Dateien nach Beratung mit dem Datenschutz und dem Rechenzentrum die kostenlose Software „Eraser“ ein. Diese Software ist zwar nicht zertifiziert, wird aber vom Bundesamt für Sicherheit in der Informationstechnik (BSI) als sicher empfohlen. Für die Löschung von personenidentifizierenden Daten, die per Email gesendet wurden, ist das Verfahren zur sicheren Löschung von Emails anzuwenden, Pfad: S:\EPID-ALL\Datenschutz (siehe Anlage). Backups werden 2 Wochen nach Durchführung der Löschung leer überschrieben, wären somit ebenfalls gelöscht und mit normalen Mitteln nicht wieder herzustellen.

Es wird ein Löschprotokoll angefertigt mit Nennung aller zu löschenden Dateien und deren Speicherorten. Das jeweils verwendete Löschverfahren wird beschrieben. Die Löschprozedur sollte nach dem 4-Augen-Prinzip durchgeführt und von allen Beteiligten unterschrieben werden. Nach Löschung der personenbezogenen Daten geht eine Kopie des Löschprotokolls an den Datenschutzbeauftragten der Abteilung EPID und an den Datenschutzbeauftragten des HZIs. Das Löschprotokoll ist zu archivieren (Beispiel für ein Löschprotokoll: siehe Anlage).

Vernichtung von personenbezogenen Daten in Papierform / Datentonne

Für die sichere Vernichtung von sensiblen Daten auf Papier hat das HZI die Firma Hans Schulz & Söhne beauftragt, die auf das Bundesdatenschutzgesetz verpflichtet ist und mindestens die Sicherheitsstufe 3 erfüllt (sichere Vernichtung von personenbezogenen Daten). Für die sichere Entsorgung sensibler Daten auf Papier steht im Küchenbereich der EPID-Abteilung eine Datentonne. Falls die Tonne geleert werden soll, ist eine entsprechende Mitteilung an das Sekretariat (Anna Kniep) zu machen. Die Sekretärin wird eine Bedarfsmeldung an den Einkauf senden und Frau Kelle (-2301) telefonisch über den Leerungsbedarf informieren, damit sie die Firma mit der Leerung beauftragt.

Die EPID-Abteilung ist dafür verantwortlich, dass kein Unbefugter Zugang zur Datentonne hat. Der Küchenbereich ist daher abends zu verschließen. Die Datentonne sollte rechtzeitig geleert werden, damit sichergestellt ist, dass keine Dokumente durch den Einwurf herausgezogen werden können. Der Schlüssel zur Datentonne wird sicher im Schlüsselkasten der Abteilung im Sekretariat aufbewahrt. Es ist allen Mitarbeitern der Abteilung nicht gestattet, die Datentonne zu öffnen. Sollte der seltene Fall eintreten, dass ein Dokument versehentlich in die Datentonne gegeben wurde, das sich auf andere Weise nicht wieder herstellen lässt, ist die Abteilungsleitung zu informieren und ein Verfahren gemeinsam nach mindestens dem 4-Augen-Prinzip zu vereinbaren, mit dem unter Aufsicht die Datentonne geöffnet und das entsprechende Dokument entnommen werden kann.

11 Aufbewahrungsfristen für Studiendaten

Die Proben (Nasenabstriche und Zahnabstriche) und Fragebogendaten sind gemäß den Regeln zur Guten wissenschaftlichen Praxis mindestens 10 Jahre aufzubewahren (http://dgepi.de/fileadmin/pdf/leitlinien/GEP_mit_Ergaenzung_GPS_Stand_24.02.2009.pdf). Durch entsprechende Protokolle wird die Vernichtung der Originaldaten nach Ablauf der 10 Jahre in entsprechender Form (Papierdokumente in Datentonne, Studiendaten durch Löschung) sichergestellt. Eine Weitergabe der Proben an interne oder externe Kooperationspartner zu

wissenschaftlichen Zwecken kann entsprechend der Probandeneinwilligung erfolgen. Die Vernichtung von Proben oder Studiendaten kann von den Teilnehmern jederzeit bis zur Vernichtung der personenidentifizierenden Daten verlangt werden. Die Teilnehmer werden über den genauen Zeitpunkt aufgeklärt.

Die pseudonymisierten Original-Fragebögen werden in einem abschließbaren Schrank im Archiv der Abteilung Epidemiologie aufbewahrt. Der Zugang zu den Räumen ist nur Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möglich, der Zugang zum Schrank nur Mitarbeitern, die an der Studie direkt beteiligt sind. Die nasalen Abstriche und die Zahnabstriche werden im gefrorenen Zustand (-70°C) in Gefrierschränken der Laboratorien der Abteilung für Epidemiologie aufbewahrt. Der Zugang zu diesen Räumlichkeiten ist Unbefugten untersagt.

12 Kontrolle durch den Datenschutzbeauftragten

Der Datenschutzbeauftragte hat an der Entwicklung des Datenschutzkonzeptes mitgewirkt.

13 Literaturverzeichnis

1. destatis - Statistisches Bundesamt. Kindertagesbetreuung in Deutschland 2012. (Wiesbaden, 2012).
2. Bradley, R.H., National Institute of Child, H. & Human Development Early Child Care Research, N. Child care and common communicable illnesses in children aged 37 to 54 months. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* **157**, 196-200 (2003).
3. National Institute of Child, H. & Human Development Early Child Care Research, N. Child care and common communicable illnesses: results from the National Institute of Child Health and Human Development Study of Early Child Care. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* **155**, 481-488 (2001).
4. Zutavern, A., *et al.* Day care in relation to respiratory-tract and gastrointestinal infections in a German birth cohort study. *Acta paediatrica* **96**, 1494-1499 (2007).
5. Zomer, T.P., *et al.* A hand hygiene intervention to decrease infections among children attending day care centers: design of a cluster randomized controlled trial. *BMC Infect Dis* **13**, 259 (2013).
6. Sacri, A.S., *et al.* Transmission of acute gastroenteritis and respiratory illness from children to parents. *The Pediatric infectious disease journal* **33**, 583-588 (2014).
7. Exner, M., *et al.* Hygiene-Tipps für's kranke Kind zu Hause. (2009).
8. Heinrich, J. & Koletzko, B. Kindergesundheit und Kinderbetreuung bei unter 3-Jährigen. *Monatsschr Kinderheilkd* **6**, 562-568 (2008).
9. Verbund Braunschweiger Kinderhäuser (VBK). Hygieneplan für den Verbund Braunschweiger Kinderhäuser. (2012).
10. Verbraucherschutz, B.d.J.u.f. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz - IfSG). (2001).
11. Niedersächsisches Landesgesundheitsamt, F.I.d.L.N. Rahmen-Hygieneplan gemäß § 36 Infektionsschutzgesetz für Kindereinrichtungen (Kinderkrippen, -gärten, -tagesstätten, auch integrativ und Kinderhorte). (2002).
12. Suess, T., *et al.* The role of facemasks and hand hygiene in the prevention of influenza transmission in households: results from a cluster randomised trial; Berlin, Germany, 2009-2011. *BMC Infect Dis* **12**, 26 (2012).
13. Bundeszahnärztekammer, K.B. Frühkindliche Karies vermeiden - Ein Konzept zur zahnmedizinischen Prävention bei Kleinkindern. (2014).
14. Raja, M., Hannan, A. & Ali, K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries research* **44**, 272-276 (2010).
15. Sztajer, H., *et al.* Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *The ISME journal* (2014).
16. Lambert, S.B., *et al.* Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics* **120**, e929-937 (2007).
17. Lambert, S.B., *et al.* Observational Research in Childhood Infectious Diseases (ORChID): a dynamic birth cohort study. *BMJ open* **2**(2012).
18. Kusel, M.M., de Klerk, N., Holt, P.G., Landau, L.I. & Sly, P.D. Occurrence and management of acute respiratory illnesses in early childhood. *Journal of paediatrics and child health* **43**, 139-146 (2007).
19. Kusel, M.M., *et al.* Role of respiratory viruses in acute upper and lower respiratory tract illness in the first year of life: a birth cohort study. *The Pediatric infectious disease journal* **25**, 680-686 (2006).

20. Jacobs, B., *et al.* Canadian Acute Respiratory Illness and Flu Scale (CARIFS): development of a valid measure for childhood respiratory infections. *Journal of clinical epidemiology* **53**, 793-799 (2000).
21. Shepperd, S., *et al.* A children's acute respiratory illness scale (CARIFS) predicted functional severity and family burden. *Journal of clinical epidemiology* **57**, 809-814 (2004).

14 Anlagen

Anlage 1: Merkblatt zur Verpflichtung auf das Datengeheimnis



Merkblatt zur Verpflichtung auf das Datengeheimnis

Das BDSG gilt für den Umgang mit personenbezogenen Daten bei nicht-öffentlichen Stellen dann, wenn die Daten unter Einsatz von Datenverarbeitungsanlagen oder nicht automatisierten Dateien (Karteien, Sammlungen gleicher Formulare) verarbeitet, genutzt oder dafür erhoben werden, es sei denn, die Erhebung, Verarbeitung oder Nutzung der Daten erfolgt ausschließlich für persönliche oder familiäre Tätigkeiten.

Im Anwendungsbereich des BDSG richtet sich die Zulässigkeit der Erhebung, Verarbeitung und Nutzung von personenbezogenen Daten nach der zentralen Vorschrift in § 4 Abs. 1 BDSG, die wie folgt lautet:

„Die Erhebung, Verarbeitung und Nutzung personenbezogener Daten sind nur zulässig, soweit dieses Gesetz oder eine andere Rechtsvorschrift dies erlaubt oder anordnet oder der Betroffene eingewilligt hat“

Die darin verwendeten Begriffe sind in § 3 BDSG wie folgt definiert:

Personenbezogene Daten sind Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse einer bestimmten oder bestimmbaren natürlichen Person (Betroffener).

Erheben ist das Beschaffen von Daten über den Betroffenen.

Verarbeiten ist das Speichern, Verändern, Übermitteln, Sperren und Löschen personenbezogener Daten. Im einzelnen ist, ungeachtet der dabei angewendeten Verfahren:

1. Speichern das Erfassen, Aufnehmen oder Aufbewahren personenbezogener Daten auf einem Datenträger zum Zwecke ihrer weiteren Verarbeitung oder Nutzung,
2. Verändern das inhaltliche Umgestalten gespeicherter personenbezogener Daten,
3. Übermitteln das Bekanntgeben gespeicherter oder durch Datenverarbeitung gewonnener personenbezogener Daten an einen Dritten in der Weise, dass
 - a. die Daten an den Dritten weitergegeben werden oder
 - b. der Dritte zur Einsicht oder zum Abruf bereitgehaltene Daten einsieht oder abruf,
4. Sperren des Kennzeichnen gespeicherter personenbezogener Daten, um ihre weitere Verarbeitung oder Nutzung einzuschränken,
5. Löschen das Unkenntlichmachen gespeicherter personenbezogener Daten.

Nutzen ist jede Verwendung personenbezogener Daten, soweit es sich nicht um Verarbeitung handelt, vom bloßen Einsichtnehmen durch Bedienstete der verantwortlichen Stelle bis zum Gebrauch der Daten.

Text der §§ 5, 43 und 44 BDSG

§ 5

Datengeheimnis

Den bei der Datenverarbeitung beschäftigten Personen ist untersagt, personenbezogene Daten unbefugt zu erheben, zu verarbeiten oder zu nutzen (Datengeheimnis). Diese Personen sind, soweit sie bei nicht öffentlichen Stellen beschäftigt werden, bei der Aufnahme ihrer Tätigkeit auf das Datengeheimnis zu verpflichten. Das Datengeheimnis besteht auch nach Beendigung der Tätigkeit fort.

§ 43

Bußgeldvorschriften

1. Ordnungswidrig handelt, wer vorsätzlich oder fahrlässig

1. entgegen § 4 d Abs. 1, auch in Verbindung mit § 4 e Satz 2, eine Meldung nicht, nicht richtig, nicht vollständig oder nicht rechtzeitig macht,
2. entgegen § 4 f Abs. 1 Satz 1 oder 2, jeweils auch in Verbindung mit Satz 3 und 6, einen Beauftragten für den Datenschutz nicht, nicht in der vorgeschriebenen Weise oder nicht rechtzeitig bestellt,
3. entgegen § 28 Abs. 4 Satz 2 den Betroffenen nicht, nicht richtig oder nicht rechtzeitig unterrichtet oder nicht sicherstellt, dass der Betroffene Kenntnis erhalten kann,
4. entgegen § 28 Abs. 5 Satz 2 personenbezogene Daten übermittelt oder nutzt,
5. entgegen § 29 Abs. 2 Satz 3 und 4 die dort bezeichneten Gründe oder die Art und Weise ihrer glaubhaften Darlegung nicht aufzeichnet,
6. entgegen § 29 Abs. 3 Satz 1 personenbezogene Daten in elektronische oder gedruckte Adress-, Rufnummern, Branchen- oder vergleichbare Verzeichnisse aufnimmt,
7. entgegen § 29 Abs. 3 Satz 2 die Übernahme von Kennzeichnungen nicht sicherstellt,
8. entgegen § 33 Abs. 1 den Betroffenen nicht, nicht richtig oder nicht vollständig benachrichtigt,
9. entgegen § 35 Abs. 6 Satz 3 Daten ohne Gegendarstellung übermittelt.
10. entgegen § 38 Abs. 3 Satz oder Abs. 4 Satz 1 eine Auskunft nicht, nicht richtig, nicht vollständig oder nicht rechtzeitig erteilt oder eine Maßnahme nicht duldet oder
11. einer vollziehbaren Anordnung nach § 38 Abs. 5 Satz 1 zuwiderhandelt.

2. Ordnungswidrig handelt, wer vorsätzlich oder fahrlässig

1. unbefugt personenbezogene Daten, die nicht allgemein zugänglich sind, erhebt oder verarbeitet,
2. unbefugt personenbezogene Daten, die nicht allgemein zugänglich sind, zum Abruf mittels automatisierten Verfahrens bereithält,
3. unbefugt personenbezogene Daten, die nicht allgemein zugänglich sind, abrufen oder sich oder einem anderen aus automatisierten Verarbeitungen oder nicht automatisierten Dateien verschafft,
4. die Übermittlung von personenbezogenen Daten, die nicht allgemein zugänglich sind, durch unrichtige Angaben erschleicht,

5. entgegen § 16 Abs. 4 Satz 1, § 28 Abs. 5 Satz 1, auch in Verbindung mit § 29 Abs. 4, § 39 Abs. 1 Satz 1 oder § 40 Abs. 1, die übermittelten Daten für andere Zwecke nutzt, indem er sie an Dritte weitergibt, oder
 6. entgegen § 30 Abs. 1 Satz 2 die in § 30 Abs. 1 Satz 1 bezeichneten Merkmale oder entgegen § 40 Abs. 2 Satz 3 die in § 40 Abs. 2 Satz 2 bezeichneten Merkmale mit den Einzelangaben zusammenführt.
3. Die Ordnungswidrigkeit kann im Falle des Absatzes 1 mit einer Geldbuße bis zu 25.000 Euro, in den Fällen des Absatzes 2 mit einer Geldbuße bis zu 250.000 Euro geahndet werden.

§ 44

Strafvorschriften

1. Wer eine in § 43 Abs. 2 bezeichnete vorsätzliche Handlung gegen Entgelt oder in der Absicht, sich oder einen anderen zu bereichern oder einen anderen zu schädigen, begeht, wird mit Freiheitsstrafe bis zu zwei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft.
2. Die Tat wird nur auf Antrag verfolgt. Antragsberechtigt sind der Betroffene, die verantwortliche Stelle, der Bundesbeauftragte für den Datenschutz und die Aufsichtsbehörde.

Anlage 2: Verpflichtungserklärung auf das Datengeheimnis



Verpflichtungserklärung auf das Datengeheimnis gemäß §5 des Bundesdatenschutzgesetzes (BDSG)

Name und Anschrift des Unternehmens:

Name des Mitarbeiters:

hiermit erkläre ich,

_____, geboren am _____

Abteilung

dass ich heute

- über die einschlägigen Vorschriften des Bundesdatenschutzgesetzes und anderer datenschutzrechtlicher Vorschriften in Kenntnis gesetzt,
- über die sich daraus ergebenden besonderen Anforderungen an die Datensicherheit und Datenschutz bei der Ausübung einer Tätigkeit vertraut gemacht (insbesondere hinsichtlich der Sorgfalt und Geheimhaltungspflichten) und
- auf das Datengeheimnis (§5 BDSG) verpflichtet wurde.

Ich wurde darüber belehrt, dass es mir gemäß § 5 Satz 1 BDSG untersagt ist, personenbezogene Daten unbefugt zu erheben, zu verarbeiten oder zu nutzen. Dies bedeutet, dass ich personenbezogene Daten nur zur rechtmäßigen Erfüllung meiner Aufgaben im Rahmen meiner Tätigkeit erheben, verarbeiten oder nutzen darf. Ich werde sämtliche im Zusammenhang mit meinem Arbeitsverhältnis bekannt werdenden personenbezogenen Daten vertraulich behandeln und nicht unbefugt an Dritte weitergeben bzw. ihnen zugänglich machen.

Zum Schutz der Daten werde ich die notwendige Sorgfalt walten lassen. Neben den gesetzlichen Vorschriften werde ich auch bestehende Anweisungen zum Datenschutz und zur Datensicherheit beachten und mir bekannt gewordene Datenschutzverletzungen unverzüglich dem betrieblichen Datenschutzbeauftragten bzw. der Unternehmensleitung melden.

Im Rahmen meiner beruflichen Tätigkeit bin ich insbesondere verantwortlich für:

- die Beachtung der vorgeschriebenen Zutritts-, Zugangs- und Zugriffsregelungen,
- das Verhindern einer unbefugten Weitergabe von personenbezogenen Daten oder IT rechnen mit darauf ab gespeicherten personenbezogenen Daten

- _____

(Hier sind alle spezifischen Punkte aufzuführen, die der jeweilig zu Verpflichtende zu beachten hat)

Das Datengeheimnis besteht auch nach Beendigung meiner Tätigkeit fort. Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Datengeheimnis sowohl arbeits- als auch strafrechtlich (zum Beispiel nach dem BDSG, dem StGB und anderen einschlägigen Rechtsvorschriften) verfolgt werden können. Sie können auch anders zu einer außerordentlichen Kündigung sein.

Meine sich aus Arbeitsvertrag und -ordnung ergebende Geheimhaltungspflicht wird durch diese Verpflichtung nicht berührt.

Einen Abdruck dieser Verpflichtungserklärung und ein entsprechendes Merkblatt habe ich erhalten.

Ort, Datum

Unterschrift: Verpflichteter

Unterschrift: Verpflichtender

Kenntnisnahme Datenschutzbeauftragter

Anlage 3: Protokoll-Vorlage für das Löschen der personenbezogenen Daten

Löschung/Sperrung der personenbezogenen Daten im Rahmen der **KraKi**-Studie

Anlass: Studienprotokoll gem. § 4e Bundesdatenschutzgesetz der KraKi-Studie und Ethikvotum der MHH

Löschfrist:

Ort der Datenerhebung: Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung
Inhoffenstr. 7
38124 Braunschweig

Bezeichnung der Daten: Personenidentifizierende Angaben der Teilnehmer der KraKi-Studie (Nachname, Vorname, Geburtsname, Adresse, Titel, Geburtstag, Nationalität, Telefonnummern und E-Mail-Adressen)

Daten: 1. MySQL-Daten, Server im HZI (Zugang nur über Thin Client Arbeitsstationen)

1.a- Terminverwaltungssoftware MODYS

1.b- weitere Dateien

2. USB-Stick am Server (für Datenaustausch)

3. E-Mails mit personenbezogenen Daten von E-Mail-Accounts der einzelnen Mitarbeiter des HZI

4. Lokale Arbeits-PCs im HZI

5. Backups (Sicherheitskopien) auf Neon und im Rechenzentrum

Löschmethode: Software: Eraser 6.0.10.2620 (Built: 22.05.2012 08:12:21)

- Löschmethode für Dateien: „German VSITR 7-passes“

- Löschmethode für nicht genutzten Speicherplatz:
„pseudorandom data 1-pass“

E-Mail Prozedere:

1. Outlook öffnen und die zu löschende(n) E-Mail(s) in einem Ordner markieren. Verbleiben sie bitte in diesem Ordner.

2. Drücken sie bitte die Taste „Shift“ und zusätzlich die Taste „Entf“ auf ihrer Tastatur und bestätigen die Frage zum Löschen der E-Mail.

3. Öffnen sie bitte den Reiter „Ordner“ und klicken sie auf das Symbol „Gelöschte Daten wiederherstellen“.

4. Nun sehen sie alle gelöschten E-Mails der letzten 30 Tage dieses Ordners. Markieren sie die entsprechende(n) E-Mail(s), um sie mit dem „X“ endgültig zu löschen.

5. Durch Bestätigen der Abfrage wird/werden die E-Mail(s) endgültig vom Exchange Server entfernt.

Nach 28 Tagen ist selbst eine Wiederherstellung aus der Datensicherung nicht mehr möglich. Die Datenbänder werden nach dieser Zeit überschrieben.

Zu löschende Dateien im Einzelnen:

| Tabelle | Variablen |
|---------|-----------|
| | |
| | |
| | |
| | |

| | |
|--|--|
| | |
|--|--|

MODYS

| Pfad | Dateiname | Inhalt |
|------|-----------|--------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

E-Mails mit personenbezogenen Daten von E-Mail-Accounts folgender Mitarbeiter:

Ausdruck des Löschprotokolls am:

Ich bestätige, die Löschung/Sperrung der personenbezogenen Daten gemäß Löschprotokoll am durchgeführt zu haben.

Datum

Unterschrift

Die Löschung der personenbezogenen Daten ist gemäß Löschprotokoll am nach dem 4-Augenprinzip erfolgt.

Datum

Unterschrift

Das Original verbleibt in der Arbeitsgruppe Epidemiologie im HZI.
Kopie geht an den Datenschutzbeauftragten des HZI in Braunschweig

Anlage 4: Einverständniserklärung zur Studie – Eltern

Einverständniserklärung wird in doppelter Ausführung verschickt. Einmal zum Verbleib beim Teilnehmer und einmal zum Zurücksenden an das Studienzentrum:

Einverständniserklärung zur Studie

KraKi – InfektionsKrankheiten bei Kindern erkennen und verhindern

Institution:

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Abteilung Epidemiologie, Inhoffenstr. 7,
38124 Braunschweig

Liebe Eltern,

in dieser Studie möchten wir untersuchen, welche Maßnahmen von den Eltern angewendet werden, um Kinder vor Infektionskrankheiten zu schützen und als wie effektiv sich diese Maßnahmen im Alltag erweisen. Außerdem ist es unser Ziel herauszufinden, ob besondere Bakterien, die im Mund leben zur Entstehung von Karies bei Milchzähnen beitragen. Für diese Studie brauchen wir Ihre Unterstützung.

Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Sie können diese jederzeit ohne jegliche Nachteile für Sie oder ihr Kind widerrufen. Die persönlichen Daten (wie Name, Adresse, Telefonnummer, E-Mail-Adresse) werden nach dem Abschluss der Studie vernichtet. Die Studiendaten werden weiterhin entsprechend der gesetzlichen Aufbewahrungspflicht 10 Jahre im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in der Abteilung Epidemiologie aufbewahrt und gegebenenfalls für weitere Analysen verwendet. Auf Wunsch können auch diese vernichtet werden. Der Wunsch auf Vernichtung muss dem Studienpersonal schriftlich bis zum Abschluss der Studie mitgeteilt werden, da aufgrund des Datenschutzkonzepts der Studie danach keine persönliche Zuordnung von Proben mehr möglich ist.

Im Folgenden geben Sie Ihre Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie ab:

„Das Informationsblatt zu der Studie habe ich erhalten und genau gelesen und verstanden. Darüber hinaus hatte ich die Möglichkeit Fragen zu stellen. Dabei wurden alle meine Fragen zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Ich habe eine Kopie des Informationsblattes und der Einverständniserklärung ausgehändigt bekommen. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Studienteilnahme zu überdenken und frei zu treffen.“

Im Folgenden bitte Zutreffendes ankreuzen

☐ **Ich stimme der Teilnahme in der Hauptgruppe der Studie freiwillig zu, diese beinhaltet:**

- Eine Befragung zu Studienbeginn zu den Verhaltensweisen zur Vermeidung von Infektionen.
- Weitere Befragungen nach zwei und vier Monaten, wie häufig seit der ersten Befragung Infektionen aufgetreten sind.

Zusätzlich laden wir Sie zur Teilnahme an zwei weiteren Teilen der Studie ein:

☐ **Ich stimme der Teilnahme in dem Modul zur Übertragung von Infektionen im Haushalt freiwillig zu, dieses beinhaltet:**

- Das Führen eines Symptومتagebuchs anstelle der zwei weiteren Fragebögen über Infektionen in der Familie.
- Die Entnahme von Nasenabstrichen bei Atemwegsinfektionen.
- Die Übereignung der entnommenen Nasenabstriche an die oben genannte Institution und die Zustimmung zur Verwendung der Proben in pseudonymisierter Form* für die in der Probandeninformation dargestellten Fragestellungen durch wissenschaftliche Kooperationspartner.

☐ **Ein weiteres Modul wendet sich an Eltern mit Kindern zwischen dem vierten und fünften Geburtstag: Ich stimme der Teilnahme in dem Modul zur Zahngesundheit freiwillig zu, dieses beinhaltet:**

- Die Entnahme der Zahnabstriche durch einen Zahnarzt am Studienanfang und ein Jahr später.
- Die Übereignung der entnommenen Zahnabstriche an die oben genannte Institution.
- Die Zustimmung, dass die Zahnabstriche unter der Verantwortung der oben genannten Institution für die oben genannte Studie für die in der Patienteninformation dargestellten Fragestellungen in pseudonymisierter Form* verwendet werden.
- Die Übermittlung des zahnärztlichen Befundes der Zahnärzte des Gesundheitsamtes Braunschweig an das Studienpersonal. Ich entbinde die Zahnärzte somit der Schweigepflicht gegenüber dem Studienpersonal, aber keiner weiteren Person. Die Befunde werden streng vertraulich behandelt und aufbewahrt.

**in einer Form, bei der die Identifikationsmerkmale wie Name und Anschrift durch ein Kennzeichen – z.B. eine Codenummer – ersetzt sind, so dass eine Zuordnung zu meiner Person nur über weitere Hilfsmittel – etwa eine Referenzliste – möglich ist)*

Zusätzliche Einwilligung (Nur für Modul zur Übertragung)

- ☐ Ich bin damit einverstanden, dass die Nasenabstriche unter der Verantwortung der oben genannten Institution **für weitere Untersuchungen** in anonymisierter Form verwendet werden *(also in einer Form, bei der eine Verbindung zwischen den Proben und meiner Person nicht oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft möglich ist).*

Zusätzliche Einwilligung (Nur für Modul zur Zahngesundheit)

- ☐ Ich bin damit einverstanden, dass die Zahnabstriche unter der Verantwortung der oben genannten Institution **für weitere Untersuchungen** in anonymisierter Form verwendet werden *(also in einer Form, bei der eine Verbindung zwischen den Proben und meiner Person nicht oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft möglich ist).*

| Kontaktdaten | |
|------------------|---|
| 1. | Anschrift Name Straße u. Hausnummer Postleitzahl, Ort |
| 2. | E-Mail-Adresse: @..... |
| 3. | Telefonnummer Festnetz: Handy: |
| Angaben zum Kind | |
| 4. | Wie ist der Name Ihres Kindes, mit dem Sie an dieser Studie teilnehmen? Vorname und Nachname |
| 5. | Welche Kindertagesstätte besucht Ihr Kind? Name, Straße |
| Weitere Angaben | |
| 6. | Wünschen Sie eine Rückmeldung zu Ihren persönlichen Studienergebnissen? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> per Post <input type="checkbox"/> per Mail (Anhang) <input type="checkbox"/> auf der Internetseite |
| 7. | Möchten Sie an der Verlosung teilnehmen? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein |

.....
 Name und Unterschrift der Mutter
 (bzw. 1. Sorgeberechtigte/-r)

.....
 Ort, Datum

.....
 Name und Unterschrift des Vaters
 (bzw. 2. Sorgeberechtigte/-r)

.....
 Ort, Datum

.....
 Unterschrift des Studienleiters

.....
 Ort, Datum

Anlage 5: Einverständniserklärung zur Studie - Kita

Einverständniserklärung wird in doppelter Ausführung verschickt. Einmal zum Verbleib in der Kita und einmal zum Zurücksenden an das Studienzentrum:

Einverständniserklärung zur Studie

KraKi – InfektionsKrankheiten bei Kindern erkennen und verhindern

Institution:

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Abteilung Epidemiologie, Inhoffenstr. 7, 38124 Braunschweig

Liebe EinrichtungsleiterInnen,

Sie haben sich freundlicherweise bereit erklärt, an der **KraKi**-Studie teilzunehmen.

In dieser Studie möchten wir untersuchen, welche Präventionsmaßnahmen in den Kindertagesstätten angewendet werden, um Kinder vor Infektionskrankheiten zu schützen und welche dabei effektiv sind.

Ihre Einwilligung zur Teilnahme ist freiwillig. Sie können diese jederzeit ohne Nachteile für Sie widerrufen. Die persönlichen Daten (wie Name, Adresse, E-Mail-Adresse) werden nach dem Abschluss der Studie vernichtet. Die Studiendaten werden weiterhin entsprechend der gesetzlichen Aufbewahrungspflicht 10 Jahre im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in der Abteilung Epidemiologie aufbewahrt und gegebenenfalls für weitere Analysen verwendet. Auf Wunsch können auch diese vernichtet werden. Der Wunsch auf Vernichtung muss dem Studienpersonal schriftlich bis zum Abschluss der Studie mitgeteilt werden, da aufgrund des Datenschutzkonzepts der Studie danach keine Zuordnung von Daten mehr möglich ist.

Das Informationsblatt zu der Studie habe ich erhalten und genau gelesen und verstanden. Darüber hinaus habe ich die Möglichkeit erhalten Fragen zu stellen. Dabei wurden alle meine Fragen zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Ich habe eine Kopie des Informationsblattes und der Einverständniserklärung ausgehändigt bekommen. Ich hatte genügend Zeit, um meine Entscheidung zur Studienteilnahme zu überdenken und frei zu treffen.

Im Folgenden bitte Zutreffendes ankreuzen.

- ☐ **Ich stimme der Teilnahme an der Studie freiwillig zu.**
- ☐ **Ausfüllen der Fragebögen**
- ☐ **Dokumentation der Fehltage**

| Kontaktdaten | |
|--------------|--|
| 8. | Anschrift Name der Kita Straße u. Hausnummer Postleitzahl, Ort Name des Leiters/ der Leiterin |
| 9. | E-Mail-Adresse: @..... |
| 10. | Telefonnummer Festnetz: Handy: |

Ort, Datum

KraKi – InfektionsKrkrankheiten bei Kindern erkennen und verhindern

Informationsblatt

Liebe Eltern,

vielen Dank für Ihr Interesse an der **KraKi**-Studie. Diese Studie wird sowohl in Braunschweiger Kindertagesstätten als auch in Braunschweiger Haushalten durchgeführt. Auf den folgenden Seiten haben wir die Studie ausführlich beschrieben. So erfahren Sie ganz genau, was wir untersuchen wollen und wie Sie uns dabei helfen können. Bitte lesen Sie die Informationen sorgfältig durch. Für weitere Fragen stehen wir Ihnen selbstverständlich gerne zur Verfügung.

Wer sind wir?

Wir sind die Arbeitsgruppe „Epidemiologische und statistische Methoden“ am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig. Als Epidemiologen untersuchen wir die Verbreitung von Krankheiten in der Bevölkerung. Außerdem wollen wir herausfinden, warum manche Menschen krank werden und manche nicht. Hier in Braunschweig untersuchen wir speziell Infektionskrankheiten.

Was sind Infektionskrankheiten?

Eine Infektion tritt auf, wenn ein Keim in den Körper eindringt und sich dort vermehrt. Es gibt ganz unterschiedliche Infektionserreger; zu den bekanntesten zählen Viren und Bakterien. Doch nicht jeder Erreger macht automatisch krank. Entscheidend ist, wie aggressiv der Keim ist und wie gut sich unser Abwehrsystem (Immunsystem) dagegen wehren kann. Bei der Geburt ist das Immunsystem noch nicht voll ausgereift. Es muss die vielen verschiedenen Infektionserreger erst kennenlernen, um Abwehrmechanismen gegen diese zu entwickeln. Dies ist ein Grund dafür, warum Kinder meist häufiger krank sind als Erwachsene.

Was wollen wir untersuchen?

Erkrankungen der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes sind bei Kindern die häufigsten Infektionserkrankungen. Die bekanntesten sind hier ein normaler Schnupfen oder Durchfall. Aber auch eine Infektion der Zähne, nämlich Karies, zählt zu den weit verbreiteten Infektionen.

Welche Maßnahmen setzen die Eltern ein, um Kinder möglichst effektiv vor Infektionserkrankungen zu schützen, und wie erfolgreich diese sind, wollen wir in dieser Studie untersuchen.

... und wie?

Hierzu möchten wir Sie zur Teilnahme an einer Studie einladen, in der wir uns mit den folgenden Fragen beschäftigen:

- Welche Maßnahmen ergreifen Sie als Eltern, um Ihre Kinder vor Infektionskrankheiten zu schützen?
- Wie häufig ist die Übertragung von Infektionen innerhalb der Familie?
- Welche Bakterien sind an der Entstehung von Karies beteiligt?

Unsere Studie besteht aus mehreren Teilen, in denen wir diese Fragen untersuchen wollen. Mittels eines Fragebogens wollen wir herausfinden, welche Maßnahmen Sie als Eltern ergreifen, um Ihre Kinder vor Infektionserkrankungen zu schützen. Weiterhin wollen wir die Effektivität dieser Maßnahmen untersuchen, indem wir die Erkrankungshäufigkeiten und die Ansteckung in den Familien ermitteln.

In einem weiteren Teil der Studie wollen wir der Infektionserkrankung Karies „auf den Zahn fühlen“. Diese Studie ist nur für Kinder vorgesehen, die bereits ihren dritten Geburtstag hatten, ihren fünften aber noch nicht. Neben Fragebögen zu den Ess- und Zahnpflegewohnheiten der Kinder ist in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt in Braunschweig die Entnahme von Zahnabstrichen der Kinder vorgesehen. Diese werden im Rahmen der zahnärztlichen Untersuchung in den Kitas mithilfe eines speziellen Wattestäbchens entnommen.

Ziele

Wir möchten Präventionsmaßnahmen identifizieren, die besonders sinnvoll in der Verhinderung von Infektionskrankheiten sind. Außerdem wollen wir herausfinden, wer sich in der Familie mit den Infektionen ansteckt und in welcher Reihenfolge dies geschieht.

Mit der Kariesstudie wollen wir den Zusammenhang zwischen verschiedenen Bakterien auf der Zahnoberfläche und die Entstehung von Karies näher untersuchen.

Worum wir sie bitten:

Teilnahme in der Hauptgruppe

Bei mehreren Kindern soll lediglich das jüngste Kind (primär) an der Studie teilnehmen.

Zu Studienbeginn bitten wir alle Eltern einen Fragebogen auszufüllen, in dem es um die Maßnahmen geht, die sie anwenden, um Infektionen bei Ihrem Kind und deren Übertragung zu verhindern. Das Ausfüllen des Fragebogens wird etwa 15-20 Minuten in Anspruch nehmen. Bitte tragen Sie in diesem Fragebogen lediglich die Maßnahmen ein, die Sie bei dem teilnehmenden Kind (dem jüngsten Kind) anwenden.

Im Abstand von jeweils zwei Monaten bitten wir Sie in einem kurzen Fragebogen anzugeben, wie oft Ihr Kind und weitere Mitglieder der Familie krank gewesen sind. Hier wird also nicht nur das an der Studie teilnehmende Kind bei der Erfassung der Krankheiten berücksichtigt, sondern auch Geschwisterkinder und alle weiteren im Haushalt lebenden Personen.

Teilnahme im Studienarm mit Symptومتagebuch und Nasenabstrichen

Eltern die bereit sind, genauer die Infektionen in der Familie zu erfassen, möchten wir bitten, **anstelle** der zwei Fragebogen zu Erkrankungen in den letzten zwei Monaten ein Symptومتagebuch auszufüllen. Die Laufzeit hiervon umfasst vier Monate, also den gesamten Studienzeitraum. Der tägliche Aufwand ist als gering einzuschätzen und sollte maximal nicht mehr als 5 Minuten in Anspruch nehmen. Das Symptومتagebuch ist eine Tabelle, in der die verschiedenen Erkrankungen aufgelistet sind. Es kann also unter anderem zwischen Atemwegserkrankungen (z.B. Erkältung) und Magen-Darm-Erkrankungen (z.B. Durchfall) unterschieden werden. Des Weiteren möchten wir Sie darum bitten, jeweils einen Nasenabstrich von dem Haushaltsmitglied zu entnehmen, welches an

einer Atemwegsinfektion erkrankt ist. Bei einem Nasenabstrich wird ein verlängertes Wattestäbchen mit einer weichen Spitze etwa 1 cm tief in ein Nasenloch eingeführt. Dies ist einfach, schmerzfrei und verletzt nicht die Nase. Sie erhalten von uns eine Anleitung mit Bildern und falls Fragen auftreten, können sie uns jederzeit anrufen.

Auch hier ist es wichtig, dass nicht nur von dem an der Studie teilnehmenden Kind Proben entnommen werden sollen, sondern auch von allen weiteren Haushaltsmitgliedern, die an einer Atemwegserkrankung leiden. Gleiches gilt für die Erfassung von Magen-Darm-Erkrankung und Atemwegserkrankungen in dem Symptomtagebuch. Auch hier sollen alle Haushaltsmitglieder erfasst werden.

Falls in einem Nasenabstrich ein nach Infektionsschutzgesetz § 7 meldepflichtiger Erreger nachgewiesen wird, muss entsprechend den gesetzlichen Vorgaben dieser Nachweis der zuständigen Gesundheitsbehörde gemeldet werden.

Teilnahme im Studienarm mit Zahnabstrichen

Kinder, die am Anfang der Studie zwischen drei und fünf Jahren alt sind, möchten wir zusätzlich um einen Zahnabstrich zur Bestimmung der Bakterien im Mund bitten. Der Zahnabstrich wird von fachkundigen Zahnärzten des Braunschweiger Gesundheitsamtes im Rahmen der regulären Vorsorgeuntersuchung in den Kitas durchgeführt. Hierbei wird mit einem Wattestäbchen auf der Zahnoberfläche entlang gestrichen. Es wird ein Abstrich von den vorderen Schneidezähnen des Oberkiefers genommen. Mit Ihrem Einverständnis erfragen wir die Ergebnisse der zahnärztlichen Untersuchung in der Kita. In dieser Gruppe möchten wir den Zahnabstrich idealerweise nach einem Jahr wiederholen.

Was tun mit Fragebögen, Symptomtagebuch und Proben?

Die ausgefüllten Fragebögen, das Symptomtagebuch und die Nasenabstriche schicken Sie bitte per Post an uns zurück. Wir bereiten alles dafür vor. Es werden weder auf den Proben noch auf den Symptomtagebüchern Ihre Namen vermerkt. Dadurch wird sichergestellt, dass nur wir eine Zuordnung der Proben vornehmen können. In diesem Zusammenhang bitten wir Sie, auch keine Namen auf andere Studienmaterialien zu schreiben, außer auf den dafür vorgesehenen Fragebogen. Sie erhalten von uns adressierte Rückumschläge und wir übernehmen selbstverständlich die Versandkosten.

Was haben Sie von der Teilnahme an der Studie?

Studien haben gezeigt, dass Kinder während der ersten Zeit in einer Kindertagesstätte gehäuft krank sind, da sie mit einer größeren Anzahl von Infektionserregern in Kontakt kommen und noch keine Abwehr ausgebildet haben. Es ist jedoch nicht ganz klar, in welchem Ausmaß die Infektionen für die Entwicklung des Immunsystems notwendig sind. Ebenfalls nicht genau bekannt ist, welche praktischen Maßnahmen die Familien davor schützen können, dass die Infektionen untereinander in den Haushalten übertragen werden. Mit Ihrer Teilnahme können Sie einen Beitrag zur Erforschung der Gesundheit von Kindern leisten. Zusätzlich können Sie nach Ablauf der Studie die Erkrankungsdaten Ihres Kindes bzw. Ihrer Familie in aufbereiteter Form von uns erhalten, falls Sie es wünschen. Wichtige Erkenntnisse für die kindliche Gesundheit und deren Entwicklung können wir nur erhalten, wenn viele Eltern bereit sind mit Ihren Kindern an der Studie teilzunehmen. Als ein

kleines Dankeschön verlosen wir unter allen Teilnehmern auch tolle Preise, die von bekannten Braunschweiger Vereinen und Einrichtungen zur Verfügung gestellt werden.

Was geschieht mit den gewonnenen Daten?

Alle persönlichen Angaben von Ihnen werden streng vertraulich behandelt. Die Studiendaten werden ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. Die Ergebnisse der Studie werden veröffentlicht, jedoch nur in anonymisierter Form, das heißt sie können keiner Person zugeordnet werden. Alle Daten werden ohne Nennung des Namens unter einer Identifikationsnummer gespeichert. Ihre persönlichen Daten (wie Name, Adresse, Telefonnummer) werden getrennt von den Untersuchungsergebnissen aufbewahrt und sicher verschlossen.

Die persönlichen Daten (wie Name, Adresse, Telefonnummer) vernichten wir nach Abschluss der Studie. Nach der Vernichtung können die Proben und Fragebogendaten nicht mehr einer Person zugeordnet werden. Die Studiendaten werden entsprechend der gesetzlichen Aufbewahrungspflicht 10 Jahre im HZI (in der Abteilung Epidemiologie) aufbewahrt. Auf Wunsch können auch diese vernichtet werden. Der Wunsch auf Vernichtung muss dem Studienpersonal schriftlich **bis zum Ende der Studie** mitgeteilt werden, weil danach keine Zuordnung der Daten mehr möglich ist. Mit Ihrem Einverständnis nutzen wir Material, was nach den für diese Studie vorgesehenen Untersuchungen übrig bleibt, in anonymisierter Form für weitere Untersuchungen.

Wurde die Studie von den zuständigen Behörden genehmigt?

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) als unbedenklich eingeschätzt und von der Datenschutzbeauftragten des Bundes genehmigt. Die Studie wurde dem Gesundheitsamt der Stadt Braunschweig vorgestellt und wird von diesem unterstützt.

Finanzierung der Studie

Die Studie wird ausschließlich aus öffentlichen Geldern finanziert. Eine kommerzielle Nutzung erfolgt nicht.

Die Teilnahme

Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig. Es entstehen für Sie keine Kosten und Sie müssen zu keiner Untersuchung anreisen, da alle Maßnahmen von Ihnen zu Hause durchgeführt werden. Sie können Ihre Teilnahme jederzeit ohne Angabe von Gründen beenden. Sie können nach Rücktritt von der Studie bis zum Ende der Studie die Vernichtung der bereits gewonnenen Proben und Daten verlangen. Falls Sie die Teilnahme abbrechen möchten, nehmen Sie bitte Kontakt mit uns auf.

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

Kristin Schlinkmann (Studienkoordinatorin)

Tel.: 0531/6181-3333

E-Mail: kraki@helmholtz-hzi.de

Wir bedanken uns herzlich für Ihre Bereitschaft zur Teilnahme!

Ja, wir sind an der **KraKi**-Studie interessiert!

Bitte senden Sie uns die Studienunterlagen zu.

Name _____

Vorname _____

Straße und Hausnummer _____

Postleitzahl und Ort _____

Telefon _____

Porto
zahlt
Empfänger



Helmholtz-Zentrum für
Infektionsforschung
Arbeitsgruppe ESME
Kristin Schlinkmann
Inhoffenstraße 7
38124 Braunschweig

Wer sind wir?

Wir sind Wissenschaftler vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig und erforschen Infektionen und das Immunsystem.

Kontakt:

Website: <http://helmholtz-hzi.de/kraki>

E-Mail: kraki@helmholtz-hzi.de

Tel.: 0531-6181-3333



Kristin Schlinkmann, MSc
(Studienkoordinatorin)



Frederic Meyer, MSc
(Zahn-und Mundhygiene)

Wir freuen uns auf Ihre Teilnahme!



Prof. Dr. Rafael Mikołajczyk (Studienleiter)



Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler (Studienleiterin)

Die Studie wird ausschließlich aus öffentlichen Geldern finanziert. Die Studie wird in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt Braunschweig durchgeführt.



KraKi -

Eine Studie zur Vorbeugung von Infektions**K**rankheiten bei **K**indern

Vorbeugung von Infektionskrankheiten

Erkrankungen der Atemwege und des Magen-Darm-Traktes sind bei Kindern die häufigsten Infektionserkrankungen. Die bekanntesten sind ein normaler Schnupfen oder Durchfall. Aber auch Karies zählt zu den weit verbreiteten Infektionen.

Doch wie kann man seine Familie hiervor schützen? Das ist eine Frage, der wir wissenschaftlich nachgehen. Dazu benötigen wir Ihre Unterstützung. Wichtige Erkenntnisse können wir nur erhalten, wenn viele Eltern bereit sind, mit Ihren Kindern an der Studie teilzunehmen.

Was wollen wir untersuchen?

Unsere Studie besteht aus verschiedenen Teilen, die sich mit den folgenden Fragen beschäftigen:

- **Welche Maßnahmen ergreifen Sie als Eltern, um Ihre Kinder vor Infektionskrankheiten zu schützen?**
- **Wie häufig ist die Übertragung von Infektionen innerhalb der Familie?**
- **Welche Bakterien sind an der Entstehung von Karies beteiligt?**

Wie läuft die Studie ab?

Während der Erkältungssaison 2014/2015 möchten wir in einer viermonatigen Studie die Infektionserkrankungen von Kindergartenkindern und ihrer Familien erfassen. Dazu erhalten Sie während des Studienzeitraumes drei Fragebögen. Alternativ führen Sie für die Dauer der Studie ein Symptombuch und nehmen Nasenabstriche im Erkrankungsfall ab. In Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt Braunschweig wollen wir auch die Zahngesundheit untersuchen. Hierbei wird im Rahmen der zahnärztlichen Untersuchung in den Kitas ein Abstrich von den Schneidezähnen mithilfe eines Wattestäbchens entnommen.



Wer kann an der Studie teilnehmen?

Alle Eltern mit einem Kind bis zu einem Alter von sechs Jahren, das eine Kindertagesstätte in Braunschweig besucht.

Wie können Sie teilnehmen?

Trennen Sie die Rückmeldekarte aus dem Flyer heraus und schicken Sie diese spätestens bis zum **20. November 2014** an uns zurück. Wir senden Ihnen dann die Studienunterlagen zu. Wenn Sie mehr über die Studie erfahren möchten, besuchen Sie uns auf unserer Website. Sie können auch jederzeit telefonisch oder per E-Mail mit uns Kontakt aufnehmen.

Was passiert mit Ihren Daten?

Die Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt und wurde der Bundesdatenschützerin zur Prüfung vorgelegt. Alle Ihre Angaben werden streng vertraulich behandelt. Die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der KraKi-Studie unterliegen der Schweigepflicht. Ihren Namen und Ihre Adresse benötigen wir ausschließlich zur Kontaktaufnahme. Die Speicherung Ihrer Daten in den Fragebögen erfolgt getrennt von Ihrem Namen. Rückschlüsse auf Einzelpersonen sind bei der Auswertung der Fragebögen daher ausgeschlossen.

Welche Vorteile bringt Ihnen die Studienteilnahme?

Nach Ablauf der Studie werden die Teilnehmer über die Ergebnisse informiert. Als kleines Dankeschön für die Teilnahme verlosen wir auch eine Reihe von tollen Preisen.



*KraKi kann
Krankheiten abwehren!*

Baseline-Fragebogen

In dieser Studie unterscheiden wir nicht zwischen Adoptiveltern und leiblichen Eltern, es werden jeweils jene Elternteile angesprochen, mit denen das Kind die meiste Zeit verbringt.

Im nachfolgenden Fragebogen geht es um Infektionen und die Betreuungssituation ihres Kindes.

| | |
|----|--|
| 1. | <p>Wie häufig war Ihr Kind in den letzten zwei Monaten an einer Infektion (Atemwegs- und/ oder Magendarmerkrankung) erkrankt? <i>(Wenn Sie keine genaue Anzahl angeben können, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</i></p> <p>_____ Mal</p> <p><input type="checkbox"/> Gar nicht</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 2. | <p>Wie viele Fehltage wegen einer Infektion (Atemwegs- und/ oder Magendarmerkrankungen) hatte ihr Kind in den letzten zwei Monaten in der Kita? <i>(Wenn Sie keine genaue Anzahl angeben können, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</i></p> <p>_____ Fehltage</p> <p><input type="checkbox"/> Keine Fehltage</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 3. | <p>Wieviel Stunden pro Woche ist ihr Kind in der Kita in Betreuung? <i>(Wenn Sie keine genaue Anzahl angeben können, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</i></p> <p>_____ Stunden pro Woche</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 4. | <p>Wie groß ist die Betreuungsgruppe in der Kita, in der Ihr Kind betreut wird? <i>(Wenn Sie keine genaue Anzahl angeben können, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</i></p> <p><input type="checkbox"/> Die Gruppe besteht aus _____ Kindern</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 5. | <p>In welchem Alter sind die Kinder in dieser Betreuungsgruppe? <i>(Wenn Sie kein genaues Alter angeben können, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</i></p> <p><input type="checkbox"/> In einem Alter zwischen _____ und _____ Jahren</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 6. | <p>Seit welchem Alter besucht Ihr Kind eine Kindertagesstätte?</p> <p>Seit einem Alter von __ __ Jahren und __ __ Monaten</p> |

| | |
|---|--|
| 7. | <p>War Ihr Kind vor dem Eintritt in die Kindertagesstätte bereits in einer Form der Betreuung? (z.B. bei einer Tagesmutter)</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, zuvor nicht → weiter mit Frage 9</p> <p><input type="checkbox"/> Ja → weiter mit Frage 8</p> |
| 8. | <p>Welchen Umfang hatte die Betreuung in der Zeit vor der Kita? (Wenn Sie keine genaue Stundenzahl angeben können, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</p> <p>_____ Stunden pro Woche</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| <p>Im nächsten Abschnitt geht es darum, wie Sie versuchen, die Übertragung der Infektionen zu vermeiden.</p> | |
| 9. | <p>Wie gehen Sie mit den folgenden Situationen um:</p> <p>Ihr Kind (<i>Maria</i>) sollte nachmittags ein anderes Kind (<i>Uwe</i>) aus der Kita besuchen. <i>Uwes</i> Mutter ruft an und sagt, dass</p> <p>a) ...Uwe etwas Husten und Schnupfen hätte, aber kein Fieber. Sie fragt, ob Sie trotzdem kommen wollen. Wie reagieren Sie?</p> <p><input type="checkbox"/> Sie sagen ab und verabreden sich für ein anderes Mal</p> <p><input type="checkbox"/> Sie gehen hin, aber passen auf, dass <i>Maria</i> von Uwe Abstand hält</p> <p><input type="checkbox"/> Sie gehen hin und treffen keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen</p> <p>b) ... Uwe am Vortag Durchfall hatte, seitdem aber alles in Ordnung sei. Sie fragt, ob Sie trotzdem kommen wollen. Wie reagieren Sie?</p> <p><input type="checkbox"/> Sie sagen ab und verabreden sich für ein anderes Mal</p> <p><input type="checkbox"/> Sie gehen hin, aber passen auf, dass <i>Maria</i> von Uwe Abstand hält</p> <p><input type="checkbox"/> Sie gehen hin und treffen keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen</p> <p>c) ... Uwe am Vortag eine Bindehautentzündung hatte, seitdem aber alles in Ordnung sei. Sie fragt, ob Sie trotzdem kommen wollen. Wie reagieren Sie?</p> <p><input type="checkbox"/> Sie sagen ab und verabreden sich für ein anderes Mal</p> <p><input type="checkbox"/> Sie gehen hin, aber passen auf, dass <i>Maria</i> von Uwe Abstand hält</p> <p><input type="checkbox"/> Sie gehen hin und treffen keine besonderen Vorsichtsmaßnahme</p> |

| 10. | <p>Wenn Ihr Kind eine Erkältung mit Fieber hat, wann lassen Sie es dann wieder in die Kita?</p> <p><input type="checkbox"/> Wenn es am Morgen keine Symptome mehr zeigt</p> <p><input type="checkbox"/> Wenn es mindestens einen Tag ohne Symptome war</p> <p><input type="checkbox"/> Wenn es mindestens zwei Tage ohne Symptome war</p> <p><input type="checkbox"/> Anderes _____</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----|--------------|--------|--------------|--------|-----|--------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|---------------------|--|--|--|--|--|-------------------|--|--|--|--|--|---------------|--|--|--|--|--|
| 11. | <p>Wenn Ihr Kind an Durchfall oder Erbrechen erkrankt ist, wann lassen Sie es dann wieder in die Kita?</p> <p><input type="checkbox"/> Wenn es am Morgen keine Symptome mehr zeigt</p> <p><input type="checkbox"/> Wenn es mindestens einen Tag ohne Symptome war</p> <p><input type="checkbox"/> Wenn es mindestens zwei Tage ohne Symptome war</p> <p><input type="checkbox"/> Anderes _____</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. | <p>Welche Symptome würden Sie davon abhalten, Ihr Kind in die Kita zu schicken?</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <thead> <tr> <th style="width: 40%;"></th> <th style="width: 10%;">Immer</th> <th style="width: 10%;">Oft</th> <th style="width: 15%;">Gelegentlich</th> <th style="width: 15%;">Selten</th> <th style="width: 10%;">Nie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Fieber ab einer Temperatur von 38 °C</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Fieber ab einer Temperatur von 37,5 °C</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Husten in der Nacht</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Starker Schnupfen</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Anderes _____</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> | | Immer | Oft | Gelegentlich | Selten | Nie | Fieber ab einer Temperatur von 38 °C | | | | | | Fieber ab einer Temperatur von 37,5 °C | | | | | | Husten in der Nacht | | | | | | Starker Schnupfen | | | | | | Anderes _____ | | | | | |
| | Immer | Oft | Gelegentlich | Selten | Nie | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fieber ab einer Temperatur von 38 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fieber ab einer Temperatur von 37,5 °C | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Husten in der Nacht | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Starker Schnupfen | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Anderes _____ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13. | <p>Wenn im Winter viele Menschen erkrankt sind, meiden Sie mit Ihrem Kind Menschenansammlungen (z.B. Geburtstage, volle Straßenbahnen o.Ä.), damit es nicht erkrankt?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nie</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | |
|-----|--|
| 14. | <p>Wenn Ihr Kind Erkältungssymptome (Husten, Schnupfen), aber kein Fieber hat, lassen Sie es zu Freunden, Geburtstagsfeiern o.Ä. gehen?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nie</p> |
| 15. | <p>Versuchen Sie den Kontakt Ihres Kindes zu einer anderen Person in der eigenen Familie zu verringern, wenn diese Person an einer Infektion erkrankt ist?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nie</p> |
| 16. | <p>Was glauben Sie, erhöht im Herbst/ Winter das Risiko an einer Infektion zu erkranken?</p> <p><input type="checkbox"/> Nasse und/ oder kalte Füße</p> <p><input type="checkbox"/> Ohne Kopfbedeckung draußen sein</p> <p><input type="checkbox"/> Rausgehen mit nassen Haaren</p> <p><input type="checkbox"/> Leichte Kleidung</p> <p><input type="checkbox"/> Ungeschützter Hals</p> <p><input type="checkbox"/> Durchzug</p> <p><input type="checkbox"/> Trockene Luft in der Wohnung</p> <p><input type="checkbox"/> Kalte Luft im Schlafzimmer</p> <p><input type="checkbox"/> Anderes_____</p> |

| | | | | | |
|-----|--|---------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|
| 17. | Wie sinnvoll halten Sie die folgenden Maßnahmen zum Schutz Ihres Kindes vor Infektionen bei <u>nassem/ regnerischem</u> Wetter (herbstlich, Temperatur 10 bis 15 °C)? | | | | |
| | | gar nicht sinnvoll | wenig sinnvoll | ziemlich sinnvoll | sehr sinnvoll |
| | Kind soll nicht rausgehen | | | | |
| | Kind soll vor allem trockene Füße behalten | | | | |
| | Kind soll vor allem einen trockenen Kopf behalten | | | | |
| | Kind kann nass werden, wichtig ist, dass es nach dem Aufenthalt im Freien im Haus direkt warm geduscht/ gebadet wird | | | | |
| | Anderes _____ | | | | |

| | | | | | |
|-----|--|---------------------------|-----------------------|--------------------------|----------------------|
| 18. | Wie sinnvoll halten Sie die folgenden Maßnahmen zum Schutz vor Infektionen bei kaltem Wetter (um 0 °C)? | | | | |
| | | gar nicht sinnvoll | wenig sinnvoll | ziemlich sinnvoll | sehr sinnvoll |
| | Kind bleibt im Haus | | | | |
| | Kind soll vor allem nicht am Kopf auskühlen (z.B. Mütze tragen) | | | | |
| | Kind soll vor allem einen Schal tragen | | | | |
| | Kind soll vor allem warme Füße behalten | | | | |
| | Kind wird nach dem Aufenthalt im Freien im Haus direkt warm geduscht/ gebadet | | | | |
| | Anderes _____ | | | | |

| | | |
|---|--|--|
| 19. | Wie lange darf Ihr Kind bei kaltem Wetter im Freien spielen? | |
| | <input type="checkbox"/> Nur kurz, es soll lieber in der warmen Wohnung bleiben <input type="checkbox"/> Es soll draußen sein, aber nur für eine bis zwei Stunden <input type="checkbox"/> Es soll möglichst viel draußen sein, solange es will <input type="checkbox"/> Es soll draußen bleiben, solange es nicht friert | |
| 20. | Wenn Ihr Kind 38 °C Fieber hat – wie gehen Sie damit um? | |
| | <input type="checkbox"/> Kind muss im Bett bleiben <input type="checkbox"/> Kind darf in der Wohnung spielen <input type="checkbox"/> Kind darf auch nach draußen gehen und spielen | |
| Im nächsten Abschnitt geht es um das Raumklima in Ihrer Wohnung. Das Raumklima beeinflusst das Risiko für Infektionen. | | |
| 21. | Wie oft und wie lange lüften sie geschlossene Räume täglich? <i>(Mehrfachnennungen möglich.)</i> | |
| | 21a) Wie oft? | 21b) Wie lange? |
| | <input type="checkbox"/> Gar nicht → weiter mit Frage 22 | <input type="checkbox"/> Weniger als 3 Minuten |
| | <input type="checkbox"/> Dauerhaftes Kippen → weiter mit Frage 22 | <input type="checkbox"/> 3 - 10 Minuten |
| | <input type="checkbox"/> Zeitweises Kippen → weiter mit Frage 22 | <input type="checkbox"/> Mehr als 10 Minuten |
| | <input type="checkbox"/> Stoßlüften mehrmals pro Woche | |
| | <input type="checkbox"/> Stoßlüften 1 – 3 Mal täglich | |
| | <input type="checkbox"/> Stoßlüften mehr als 3 mal täglich | |
| | <input type="checkbox"/> Stoßlüften immer vor der Schlafenszeit | |
| | <input type="checkbox"/> Anderes _____ | |
| 22. | Welche Temperatur haben Sie im Winter durchschnittlich in Ihren Wohnräumen (wie Wohnzimmer, Spielzimmer des Kindes etc.)? | |
| | _____ °C in den Wohnräumen | |
| | <input type="checkbox"/> Weiß nicht | |

| | |
|-----|--|
| 23. | <p>Welche Temperatur haben Sie im Winter durchschnittlich in Ihren Schlafräumen und denen Ihres Kindes?</p> <p>_____ °C im Schlafzimmer des Kindes</p> <p>_____ °C im Schlafzimmer der Eltern</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 24. | <p>Schläft Ihr Kind bei geöffnetem Fenster? <i>(Gekipptes oder voll geöffnetes Fenster)</i></p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer, wenn es über _____°C sind</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, nie</p> |
| 25. | <p>Wissen Sie, wie hoch die Luftfeuchtigkeit in Ihren Innenräumen während der Heizperiode ist?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, durchschnittlich _____ Prozent</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, weiß ich nicht</p> |
| 26. | <p>Bemühen Sie sich die Luftfeuchtigkeit in den Räumen zu erhöhen bzw. auf einem bestimmten Wert zu halten?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, nie</p> |

Der nächste Abschnitt beschäftigt sich nun mit Maßnahmen, um Infektionen bei Ihrem Kind vorzubeugen.

27. Haben Sie in Vorbereitung auf den Winter etwas unternommen, das speziell darauf ausgerichtet war, das Immunsystem Ihres Kindes zu stärken?

- ☐ Nein, eigentlich nicht
- ☐ Ja, wir sind an die See gefahren
- ☐ Ja, wir sind ins Hochgebirge gefahren
- ☐ Ja, wir sind zur Kur gefahren
- ☐ Ja, wir sind in Solethermen gefahren
- ☐ Ja, wir nutzen regelmäßig die Sauna
- ☐ Anderes _____

28. Geben Sie Ihrem Kind bestimmte Mittel, die das Immunsystem stärken sollen und somit vor Infektionen schützen sollen?

| | Nie | Selten | Gelegentlich | Oft | Täglich |
|-----------------------|-----|--------|--------------|-----|---------|
| Homöopathische Mittel | | | | | |
| Vitamine | | | | | |
| Schüsslersalze | | | | | |
| Naturheilmittel | | | | | |
| Nasendusche | | | | | |
| Anderes: | | | | | |

29. Wie viele Stunden verbrachte Ihr Kind in diesem Sommer am Wochenende pro Tag durchschnittlich draußen im Freien, wenn es nicht regnet?

- ☐ Bis zu einer Stunde
- ☐ Ein bis drei Stunden
- ☐ Mehr als drei Stunden

Die nächste Frage gibt Ihnen die Möglichkeit, weitere Maßnahmen zu nennen, die wir nicht abgefragt haben. Dies ist **besonders wichtig** für uns, da wir nur so die Maßnahmen erfassen können, die uns bisher nicht bekannt sind.

30. **Ergreifen Sie andere Maßnahmen, welche bisher nicht genannt wurden, um Ihr Kind vor einer Infektionserkrankung zu schützen?** *Dies können Maßnahmen sein, die hier zuvor nicht abgefragt wurden, die Sie aber dennoch praktizieren.*

Ja, und zwar

Bei den nächsten Fragen geht es nun um die Übertragung von Infektionen.

31. **Wenn Ihr Kind erkrankt ist, achten Sie darauf, dass weitere Familienmitglieder [Sie oder Geschwister des Kindes] nicht von demselben Teller oder mit demselben Besteck essen?**

- ☐ Nie
- ☐ Selten
- ☐ Gelegentlich
- ☐ Oft
- ☐ Immer

32. **Wenn Ihr Kind erkrankt ist, achten Sie darauf, dass weitere Familienmitglieder [Sie oder Geschwister des Kindes] nicht den gleichen Becher nutzen?**

- ☐ Nie
- ☐ Selten
- ☐ Gelegentlich
- ☐ Oft
- ☐ Immer

| | |
|-----|--|
| 33. | <p>Wenn Ihr Kind erkrankt ist, reinigen Sie die Spielzeuge Ihres Kindes bevor sein Geschwister oder ein anderes Kind damit spielt (z.B. durch Abwaschen mit Wasser)?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer nach Benutzung</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, nie</p> |
| 34. | <p>Achten Sie darauf bzw. haben Sie als Ihr Kind noch klein war darauf geachtet, dass Ihr Kind Spielsachen vom Boden nicht in den Mund nahm/nimmt?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, nie</p> |
| 35. | <p>Wo nutzen Sie Desinfektionsmittel in Ihrem Haushalt?</p> <p><input type="checkbox"/> Wir nutzen kein Desinfektionsmittel</p> <p><input type="checkbox"/> Im Badezimmer</p> <p><input type="checkbox"/> In der Küche</p> <p><input type="checkbox"/> In den Wohnräumen</p> |
| 36. | <p>Haben Sie eine Regel, wie häufig Sie die Bettwäsche Ihres Kindes normalerweise wechseln (wenn es keinen besonderen Grund, wie z.B. einnässen gibt)?</p> <p><input type="checkbox"/> Wöchentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Monatlich</p> <p><input type="checkbox"/> Zweimonatlich</p> <p><input type="checkbox"/> Dreimonatlich</p> <p><input type="checkbox"/> Halbjährlich</p> <p><input type="checkbox"/> Unterschiedlich</p> |

| | |
|-----|--|
| 37. | <p>Wie häufig wechseln Sie die Bettwäsche Ihres Kindes, wenn es an einer Infektion <u>erkrankt</u> ist? <i>(Mehrfachnennungen möglich.)</i></p> <p><input type="checkbox"/> Wie im Normalfall</p> <p><input type="checkbox"/> Täglich</p> <p><input type="checkbox"/> Nach dem Schwitzen</p> <p><input type="checkbox"/> Nach dem Ende der Erkrankung</p> |
| 38. | <p>Waschen Sie die normale Wäsche Ihres Kindes getrennt von der restlichen Wäsche?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> |
| 39. | <p>Waschen Sie Wäsche, die mit Durchfall oder Erbrochenem verschmutzt ist, getrennt von der restlichen Wäsche?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, oft</p> <p><input type="checkbox"/> Gelegentlich</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, nie</p> |
| 40. | <p>Geben Sie dem Waschmittel desinfizierende Waschzusätze zu?</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, immer</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, aber nur wenn ein Haushaltsmitglied erkrankt ist</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, manchmal und zwar wenn, _____</p> <p><input type="checkbox"/> Nein, nie</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |

| | |
|--|--|
| 41. | Bei welcher Temperatur waschen Sie die folgenden Wäscheteile? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Bettwäsche bei _____ °C <input type="checkbox"/> Bettwäsche des Kindes bei _____ °C <input type="checkbox"/> Kleidung des Kindes bei _____ °C <input type="checkbox"/> Unterwäsche des Kindes bei _____ °C <input type="checkbox"/> Eigene Unterwäsche bei _____ °C |
| 42. | Bügeln Sie Ihre Wäsche? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Nein, ich bügele keine Wäsche <input type="checkbox"/> Ja, ich bügele die Wäsche, aber nur der Optik wegen <input type="checkbox"/> Ja, ich bügele Unterwäsche, um Bakterien abzutöten <input type="checkbox"/> Ja, ich bügele Bettwäsche, um Bakterien abzutöten <input type="checkbox"/> Ja, ich bügele Handtücher, um Bakterien abzutöten <input type="checkbox"/> Anderes _____ |
| <p><i>Atemschutzmasken sieht man oft im Fernsehen. Gerade in Japan oder China sind sie sehr verbreitet. Es konnte nachgewiesen werden, dass Maskenträger einen vierfach höheren Schutz vor Atemwegsinfektionen genießen als ungeschützte Vergleichspersonen.</i></p> | |
| 43. | Haben Sie schon einmal von Atemschutzmasken gehört? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein |
| 44. | Würden Sie Atemschutzmasken im Fall von schweren Atemwegserkrankungen in Ihrem Haushalt nutzen? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Keinesfalls <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Auf jeden Fall <input type="checkbox"/> Weiß nicht |

| | |
|--|---|
| 45. | Haben Sie jemals Atemschutzmasken im Fall von Atemwegserkrankungen in Ihrem Haushalt genutzt? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein |
| Die nächsten Fragen beziehen sich noch einmal konkret auf Verhaltensweisen im Badezimmer. | |
| 46. | Nutzen Sie Desinfektionsmittel für die Toilette (Toilettenbrille), wenn ein Haushaltsmitglied an Durchfall und/oder Erbrechen erkrankt ist? <input type="checkbox"/> Ja, immer <input type="checkbox"/> Ja, oft <input type="checkbox"/> Gelegentlich <input type="checkbox"/> Selten <input type="checkbox"/> Nein, nie |
| 47. | Wie regelmäßig reinigen Sie Ihre Toilette mit Desinfektionsmittel, wenn ein Haushaltsmitglied an Durchfall und/oder Erbrechen erkrankt ist? <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Weniger als einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Nie |
| 48. | Nutzen Sie separate <u>Handtücher</u> für alle Haushaltsmitglieder? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Das unterscheidet sich manchmal |
| 49. | Nutzen Sie separate <u>Duschtücher</u> für alle Haushaltsmitglieder? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Das unterscheidet sich manchmal |

| | |
|-----|---|
| 50. | Wie regelmäßig wechseln Sie normalerweise die <u>Handtücher</u> im Badezimmer? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Alle zwei Wochen <input type="checkbox"/> Weniger als alle zwei Wochen |
| 51. | Wie regelmäßig wechseln Sie normalerweise die <u>Duschtücher</u> im Badezimmer? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Alle zwei Wochen <input type="checkbox"/> Weniger als alle zwei Wochen |
| 52. | Wie regelmäßig wechseln Sie die <u>Handtücher</u> im Badezimmer, wenn eine Person <u>erkrankt ist</u>? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Alle zwei Wochen <input type="checkbox"/> Weniger als alle zwei Wochen |
| 53. | Wie regelmäßig wechseln Sie die <u>Duschtücher</u> im Badezimmer, wenn eine Person <u>erkrankt ist</u>? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Alle zwei Wochen <input type="checkbox"/> Weniger als alle zwei Wochen |

Die nächste Frage gibt Ihnen wieder die Möglichkeit, weitere Maßnahmen zu nennen, die wir nicht abgefragt haben. Dies ist **besonders wichtig** für uns, da wir nur so die Maßnahmen erfassen können, die uns bisher nicht bekannt sind.

54. **Wie schützen Sie Familienmitglieder vor einer Ansteckung, wenn jemand im Haushalt an einer Infektion erkrankt ist?** („spezielle Techniken“, „Verhaltensweisen“)

☐ Freitextfeld

☐ Keine bestimmten Techniken

Die nächsten Fragen beziehen sich auf das Verhalten beim Wickeln Ihres Kindes.

55. **Wird Ihr Kind noch gewickelt?**

☐ Ja

☐ Nein

56. **Wo wickeln Sie Ihr Kind in der Regel bzw. haben Sie es gewickelt?**

☐ Kinderzimmer

☐ Badezimmer

☐ Wohnzimmer

☐ Küche

☐ Unterschiedlich

☐ Anderes_____

57. **Wie oft reinigen Sie die Wickelunterlage Ihres Kindes bzw. haben Sie diese gereinigt?**

☐ Ich nutze Einmal-Wickelunterlagen

☐ Nach jedem Wickeln

☐ Täglich

☐ Mehrmals pro Woche

☐ Wöchentlich

☐ Weniger als einmal pro Woche

| | |
|--|---|
| 58. | Wie entsorgen Sie die Windeln Ihres Kindes bzw. haben Sie diese entsorgt? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ich nutze ausschließlich wiederverwendbare Windeln <input type="checkbox"/> In einer separaten Plastiktüte/ Windeleimer <input type="checkbox"/> Zusammen mit dem restlichen Haushaltsmüll <input type="checkbox"/> Anderes _____ |
| In dem nächsten Abschnitt geht es um Haustiere in Ihrem Haushalt. | |
| 59. | Haben Sie ein Haustier? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ja → weiter mit Frage 60 <input type="checkbox"/> Nein → weiter mit Frage 68 |
| 60. | Welche Art von Haustier halten Sie? <i>(Mehrfachantworten möglich)</i> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Hund; Anzahl _____ <input type="checkbox"/> Katze; Anzahl _____ <input type="checkbox"/> Vogel; Anzahl _____ <input type="checkbox"/> Nagetier, und zwar _____ Anzahl _____ <input type="checkbox"/> Reptil, und zwar _____ Anzahl _____ <input type="checkbox"/> Anderes, und zwar _____ Anzahl _____ |
| 61. | Wird ihr Haustier regelmäßig geimpft? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein |
| 62. | Wird ihr Haustier regelmäßig entwurmt? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein |

| | |
|-----|---|
| 63. | Füttern Sie ihr Haustier mit spezieller Tiernahrung (z.B. Hundefutter) oder füttern Sie es mit Lebensmitteln aus dem Haushalt? <input type="checkbox"/> Tiernahrung <input type="checkbox"/> Lebensmittel aus dem Haushalt <input type="checkbox"/> Unterschiedlich |
| 64. | Wo schläft ihr Haustier/ bzw. befindet sich der Käfig o.Ä.? <input type="checkbox"/> In einem separaten Raum <input type="checkbox"/> Im Wohnzimmer <input type="checkbox"/> Im gesamten Wohnraum <input type="checkbox"/> Im Kinderzimmer <input type="checkbox"/> In der Küche <input type="checkbox"/> Im Badezimmer <input type="checkbox"/> Außerhalb des Hauses <input type="checkbox"/> Unterschiedlich |
| 65. | Wo füttern Sie Ihr Haustier? <input type="checkbox"/> Im Käfig <input type="checkbox"/> In der Wohnung <input type="checkbox"/> Im Flur <input type="checkbox"/> Außerhalb des Hauses <input type="checkbox"/> Unterschiedlich <input type="checkbox"/> Anderes _____ |

| | |
|---|---|
| 66. | Wie regelmäßig reinigen Sie die Futterstelle Ihres Haustieres? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Weniger als einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Unterschiedlich <input type="checkbox"/> Gar nicht |
| 67. | Wie regelmäßig reinigen Sie das Quartier Ihres Haustieres (z.B. Käfig oder Hundekorb)? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Täglich <input type="checkbox"/> Mehrmals pro Woche <input type="checkbox"/> Einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Weniger als einmal pro Woche <input type="checkbox"/> Unterschiedlich <input type="checkbox"/> Gar nicht |
| Im Folgenden bitten wir Sie die Verhaltensweisen Ihres Kindes einzuschätzen. | |
| 68. | Wäscht Ihr Kind sich schon überwiegend allein die Hände? <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein → weiter mit Frage 72 |
| 69. | Was schätzen Sie, wie häufig sich Ihr Kind an einem normalen Wochenendtag (z.B. Sonntag) die Hände wäscht? <p>_____ Mal</p> |

| | | | | | | |
|---------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 70. | Welche der folgenden Maßnahmen setzt Ihr Kind beim Händewaschen um? | | | | | |
| | | nie | Selten | gelegentlich | oft | immer |
| | Warmes Wasser nutzen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Seife nutzen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Mindestens 30 Sekunden waschen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Ordentlich abtrocknen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Anderes _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 71. | Wie häufig wäscht Ihr Kind die Hände in den folgenden Situationen? | | | | | |
| | | nie | Selten | gelegentlich | oft | immer |
| | Vor dem Essen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nach Toilette | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Von draußen kommend | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nach Tierkontakt | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nach Naseputzen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Anderes _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| 72. | Nutzt Ihr Kind in den folgenden Situationen Desinfektionsmittel für seine Hände? | | | | | |
| | | nie | selten | gelegentlich | oft | immer |
| | Vor dem Essen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nach Toilette | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Von draußen kommend | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nach Tierkontakt | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nach Naseputzen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Anderes _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

| | | | | | | |
|--|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 73. | Wie verhält sich Ihr Kind beim Husten / Niesen? | | | | | |
| | | Nie | selten | gelegentlich | oft | immer |
| | Die Hand vorhalten | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | In ein Papiertaschentuch niesen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | In ein Stofftaschentuch niesen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | In die Armbeuge niesen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Papiertaschentuch nur einmalig nutzen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Anderes _____ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Bei den folgenden Fragen geht es um Ihr Kind. | | | | | | |
| 74. | Welches Geschlecht hat Ihr Kind? <input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/> männlich | | | | | |
| 75. | Wann wurde Ihr Kind geboren? ____ / ____ / ____ Tag / Monat / Jahr | | | | | |
| 76. | Wie groß ist Ihr Kind? <i>(Wenn Sie die aktuelle Größe nicht wissen, vielleicht wäre es Ihnen möglich Ihr Kind zu messen.)</i> cm (ohne Nachkommastellen) | | | | | |
| 77. | Wie viel wiegt Ihr Kind? <i>(Wenn Sie das aktuelle Gewicht nicht wissen, vielleicht wäre es Ihnen möglich Ihr Kind zu wiegen.)</i> kg (ohne Nachkommastellen) | | | | | |
| 78. | In welcher Schwangerschaftswoche wurde Ihr Kind geboren?Schwangerschaftswoche | | | | | |
| 79. | Ist Ihr Kind per Kaiserschnitt auf die Welt gekommen? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein | | | | | |
| 80. | Wie lange wurde Ihr Kind ausschließlich gestillt? <i>Geben Sie bitte nur den Zeitraum an, in dem Sie keinerlei Getränke oder Beikost gegeben haben.</i> <input type="checkbox"/> gar nicht <input type="checkbox"/> bis heute __ __ Monate <input type="checkbox"/> weiß nicht | | | | | |

| | |
|---|--|
| 81. | Wie lange wurde Ihr Kind überwiegend gestillt und Sie haben nur Wasser, Tee oder Fruchtsäfte gegeben (keine Milchnahrung, keine Beikost)? <input type="checkbox"/> gar nicht <input type="checkbox"/> bis heute __ __ Monate <input type="checkbox"/> weiß nicht |
| 82. | Wie lange wurde Ihr Kind insgesamt gestillt? <i>Geben Sie bitte den Zeitraum an, in dem Sie zumindest noch einmal täglich gestillt haben.</i> <input type="checkbox"/> gar nicht <input type="checkbox"/> bis heute __ __ Monate <input type="checkbox"/> weiß nicht |
| Im Folgenden möchten wir Sie gerne noch zum Rauchverhalten im Haushalt fragen. | |
| 83. | Zunächst geht es um das Rauchverhalten der Mutter . Haben Sie jemals Zigaretten, Zigarren, Zigarillos, Pfeife oder andere Tabakprodukte geraucht? <i>Wenn Sie bis auf ganz seltenes Probieren NICHT geraucht haben, antworten Sie bitte „Ich habe nie geraucht“. Berücksichtigen Sie bitte NICHT das Rauchen einer Wasserpfeife.</i> <input type="checkbox"/> Ich habe nie geraucht → weiter mit Frage 88 <input type="checkbox"/> Ja, ich rauche bis heute → weiter mit Frage 84 <input type="checkbox"/> Ja, ich habe früher geraucht → weiter mit Frage 0 |
| 84. | Wie viele Zigaretten rauchen Sie (die Mutter) derzeit durchschnittlich? <i>Bitte geben Sie die Anzahl pro Tag oder, wenn Sie gelegentlich rauchen, pro Woche oder pro Monat an.</i> Anzahl Zigaretten:... __ __ __ → Angabe pro Tag <input type="checkbox"/> oder Angabe pro Woche <input type="checkbox"/> oder Angabe pro Monat <input type="checkbox"/> |
| 85. | Rauchen Sie (die Mutter) in Anwesenheit Ihres Kindes? <input type="checkbox"/> oft <input type="checkbox"/> gelegentlich <input type="checkbox"/> selten <input type="checkbox"/> nie |
| 86. | Rauchen Sie (die Mutter) innerhalb der Wohnung? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> gelegentlich <input type="checkbox"/> nein |

| | |
|-----|--|
| 87. | <p>Haben Sie (die Mutter) während der Schwangerschaft geraucht?</p> <p><input type="checkbox"/> ja, so viel wie vorher auch</p> <p><input type="checkbox"/> ja , aber deutlich weniger als vorher</p> <p><input type="checkbox"/> nein</p> |
| 88. | <p>In den nächsten Fragen geht es um das Rauchverhalten des Vaters.</p> <p>Haben Sie jemals Zigaretten, Zigarren, Zigarrillos, Pfeife oder andere Tabakprodukte geraucht?</p> <p><i>Wenn Sie bis auf ganz seltenes Probieren NICHT geraucht haben, antworten Sie bitte „Ich habe nie geraucht“. Berücksichtigen Sie bitte NICHT das Rauchen einer Wasserpfeife.</i></p> <p><input type="checkbox"/> Ich habe nie geraucht → weiter mit Frage 92</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, ich rauche bis heute → weiter mit Frage 89</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, ich habe früher geraucht → weiter mit Frage 92</p> |
| 89. | <p>Wie viele Zigaretten rauchen Sie (der Vater) derzeit durchschnittlich?</p> <p><i>Bitte geben Sie die Anzahl pro Tag oder, wenn Sie gelegentlich rauchen, pro Woche oder pro Monat an.</i></p> <p>Anzahl Zigaretten:... __ __ __ → Angabe pro Tag <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">oder</p> <p style="text-align: right;">Angabe pro Woche <input type="checkbox"/></p> <p style="text-align: center;">oder</p> <p style="text-align: right;">Angabe pro Monat <input type="checkbox"/></p> |
| 90. | <p>Rauchen Sie (der Vater) in Anwesenheit Ihres Kindes?</p> <p><input type="checkbox"/> oft <input type="checkbox"/> gelegentlich <input type="checkbox"/> selten <input type="checkbox"/> nie</p> |
| 91. | <p>Rauchen Sie (der Vater) innerhalb der Wohnung?</p> <p><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> gelegentlich <input type="checkbox"/> nein</p> |

Im folgenden Abschnitt bitten wir um einige Angaben zu den Eltern des Kindes. Die Fragen beziehen sich jeweils auf Mutter und Vater. Wir werten die Daten nicht für die jeweilige Person aus, sondern nur für Gruppen.

Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen jeweils für die Mutter und den Vater des Kindes.

| | | | |
|-----|--|--------------------------|--------------------------|
| 92. | Alter der Mutter Jahre | | |
| 93. | Alter des Vaters Jahre | | |
| 94. | Welchen höchsten allgemeinbildenden Schulabschluss hat die Mutter / der Vater des Kindes? | Mutter | Vater |
| | Schüler/in, besucht eine allgemeinbildende Vollzeitschule | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Von der Schule abgegangen ohne Hauptschulabschluss (Volksschulabschluss) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Hauptschulabschluss (Volksschulabschluss) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Realschulabschluss (Mittlere Reife) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Polytechnische Oberschule der DDR mit Abschluss der 8. oder 9. Klasse | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Polytechnische Oberschule der DDR mit Abschluss der 10. Klasse | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Fachhochschulreife, Abschluss einer Fachoberschule | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Allgemeine oder fachgebundene Hochschulreife/Abitur (Gymnasium bzw. EOS, auch EOS mit Lehre) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Abitur über den zweiten Bildungsweg nachgeholt | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Einen anderen Schulabschluss | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | und zwar: Mutter: _____ Vater: _____ | | |
| | Weiß nicht | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

| | | | |
|------------|--|--------------------------|--------------------------|
| 95. | Welchen höchsten Ausbildungsabschluss hat die Mutter / der Vater des Kindes? | Mutter | Vater |
| | Noch in beruflicher Ausbildung (Berufsvorbereitungsjahr, Auszubildende/r, Praktikant/in, Student/in) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Schüler/in und besuche eine berufsorientierte Aufbau-, Fachschule oder Ähnliches | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Keinen beruflichen Abschluss und nicht in beruflicher Ausbildung | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Beruflich-betriebliche Berufsausbildung (Lehre) abgeschlossen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Beruflich-schulische Ausbildung (Berufsfachschule, Handelsschule, Vorbereitungsdienst für den mittleren Dienst in der öffentlichen Verwaltung) abgeschlossen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Ausbildung an einer Fachschule der DDR abgeschlossen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Ausbildung an einer Fach-, Meister-, Technikerschule, Berufs- oder Fachakademie abgeschlossen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Bachelor an (Fach-)Hochschule abgeschlossen | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Fachhochschulabschluss (z. B. Diplom, Master) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Universitätsabschluss (z. B. Diplom, Magister, Staatsexamen, Master) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Promotion | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Einen anderen Ausbildungsabschluss, | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | und zwar: Mutter: _____ Vater: _____ | | |
| Weiß nicht | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

| | | | |
|-----|--|--------------------------|--------------------------|
| 96. | Welche Erwerbssituation hat die Mutter / der Vater des Kindes? (Nur eine Nennung möglich) | Mutter | Vater |
| | Vollzeiterwerbstätig (Arbeitszeit von 35 Stunden und mehr) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Teilzeiterwerbstätig (Arbeitszeit von 15 bis 34 Stunden) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Gelegentlich oder unregelmäßig beschäftigt | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Mutterschafts-, Erziehungsurlaub, Elternzeit oder sonstige Beurlaubung | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Nicht erwerbstätig, und zwar | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | – Schüler(in) / Student(in) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | – arbeitslos | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | – Hausfrau / Hausmann | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | – Wehr-, Zivildienstleistender | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | – in einem freiwilligen öologischen / sozialen / wissenschaftlichen Jahr | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | – aus anderen Gründen nicht erwerbstätig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Weiß nicht | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

| | |
|-----|---|
| 97. | Wie hoch ist das Haushaltsnettoeinkommen in Ihrem Haushalt? <i>Das Haushaltsnettoeinkommen errechnet sich, indem vom Haushaltsbruttoeinkommen (alle Einnahmen des Haushalts aus Erwerbstätigkeit, aus Vermögen, aus öffentlichen und nichtöffentlichen Transferzahlungen sowie aus Untervermietung) Einkommensteuer, Kirchensteuer und Solidaritätszuschlag sowie die Pflichtbeiträge zur Sozialversicherung abgezogen werden.</i> |
| | <input type="checkbox"/> Unter 1.300 € |
| | <input type="checkbox"/> 1.300 bis 2.600 € |
| | <input type="checkbox"/> 2.600 bis 3.600 € |
| | <input type="checkbox"/> 3.600 bis 5.000 € |
| | <input type="checkbox"/> 5.000 bis 10.000 € |
| | <input type="checkbox"/> 10.000 bis 18.000 € |
| | <input type="checkbox"/> Mehr als 18.000 € |

| In dem nächsten Teil geht es um das Geburtsland der Familie und die Haushaltszusammensetzung. | |
|---|--|
| 98. | In welchem Land ist Ihr Kind geboren? <input type="checkbox"/> Deutschland <input type="checkbox"/> In einem anderen Land, und zwar |
| 99. | In welchem Land ist die Mutter des Kindes geboren? <input type="checkbox"/> Deutschland <input type="checkbox"/> In einem anderen Land, und zwar |
| 100. | In welchem Land ist der Vater des Kindes geboren? <input type="checkbox"/> Deutschland <input type="checkbox"/> In einem anderen Land, und zwar |
| 101. | Welche Staatsangehörigkeit haben Sie, Ihr Partner und Ihr Kind? Mutter:..... Vater:..... Kind:..... |
| 102. | Seit wann leben Sie in Deutschland (bitte die Jahreszahl angeben)? Mutter:..... Vater:..... Kind:..... |
| 103. | Welches ist die Muttersprache der Mutter/des Vaters/des Kindes? Mutter:..... Vater:..... Kind:..... |
| 104. | Welche Sprache wird hauptsächlich zu Hause gesprochen? <input type="checkbox"/> Deutsch <input type="checkbox"/> Andere:..... |
| 105. | Wie viele Personen leben permanent in Ihrem Haushalt? (Einschließlich des Kindes) Anzahl: _ _ |

| | |
|------|--|
| 106. | Wie viel Quadratmeter umfasst die Gesamtfläche Ihres Hauses/ Ihrer Wohnung? <i>(Wenn Sie die genauen Maße nicht wissen, geben Sie bitte eine Schätzung an.)</i> _____m ² |
| 107. | Wie viele Zimmer befinden sich in Ihrem Haus/ Ihrer Wohnung? _____ Zimmer |

Zahn-und Mundhygiene bei Kindergartenkindern zwischen 3 und 5 Jahren

(Bitte den Fragebogen nur ausfüllen, wenn Ihr Kind bereits seinen dritten, aber noch nicht seinen fünften Geburtstag hatte)

| | |
|----|---|
| 1. | Wie viele Milchzähne hat Ihr Kind? _____ |
| 2. | Wie oft gehen Sie mit Ihrem Kind zum Zahnarzt? (Denken Sie hierbei etwa an das letzte Jahr) <input type="checkbox"/> Etwa alle 3 Monate <input type="checkbox"/> Etwa alle 6 Monate <input type="checkbox"/> Etwa alle 9 Monate <input type="checkbox"/> Etwa alle 12 Monate <input type="checkbox"/> Seltener als einmal im Jahr <input type="checkbox"/> Gar nicht |
| 3. | Wie verliefen die Zahnarztbesuche? <input type="checkbox"/> Gut <input type="checkbox"/> Eher gut <input type="checkbox"/> Eher schwierig <input type="checkbox"/> Schwierig |
| 4. | Hat ein Zahnarzt festgestellt, dass Ihr Kind bereits Karies hatte? Wenn Ja, wie viele Zähne waren betroffen? <input type="checkbox"/> Nein, bisher kein Karies → weiter mit Frage 7 <input type="checkbox"/> Ja, aber ich weiß nicht, wie viele Zähne betroffen waren <input type="checkbox"/> 1 Zahn betroffen <input type="checkbox"/> 2 Zähne betroffen <input type="checkbox"/> Mehr als 2 Zähne betroffen |
| 5. | Hat Ihr Kind Zahnfüllungen? <input type="checkbox"/> Nein, keine Zahnfüllung <input type="checkbox"/> Eine Füllung <input type="checkbox"/> Zwei Füllungen <input type="checkbox"/> Mehr als zwei Füllungen |

| | |
|-----|--|
| | |
| 6. | <p>Mussten bei Ihrem Kind schon Zähne wegen Karies entfernt werden? Wenn Ja, wie viele?</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> 1 Zahn musste entfernt werden</p> <p><input type="checkbox"/> 2 Zähne mussten entfernt werden</p> <p><input type="checkbox"/> mehr als 2 Zähne mussten entfernt werden</p> |
| 7. | <p>Hatte Ihr Kind innerhalb der letzten sechs Monate Zahnfleischbluten (sog. Gingivitis)? <i>(Zahnfleischbluten ohne, dass Ihr Kind einen Unfall hatte; zumeist tritt das Bluten nach dem Zähneputzen auf)</i></p> <p><input type="checkbox"/> Ja</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 8. | <p>Hat oder hatte Ihr Kind jemals eine Aphte (kleine, meist rundliche und schmerzende Schädigung des Zahnfleischs, der Zunge, der Lippen oder des Rachenraums)</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Erst einmal</p> <p><input type="checkbox"/> 2-3 Mal</p> <p><input type="checkbox"/> Öfter als 3 Mal</p> |
| 9. | <p>Wie häufig putzt Ihr Kind an einem durchschnittlichen Tag zu Hause die Zähne?</p> <p>_____ Mal</p> |
| 10. | <p>Wie lange putzt Ihr Kind zu Hause in etwa die Zähne?</p> <p><input type="checkbox"/> Weniger als 1 Minute</p> <p><input type="checkbox"/> 1 Minute</p> <p><input type="checkbox"/> 2 Minuten</p> <p><input type="checkbox"/> 3 Minuten</p> <p><input type="checkbox"/> 4 Minuten</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 11. | <p>Unterstützen Sie Ihr Kind in der Regel bei dem Zähneputzen (sog. „Vorputzen“ oder „Nachputzen“), wenn es die Zähne zu Hause putzt?</p> <p><input type="checkbox"/> Vorputzen und/oder Nachputzen</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> |

| | |
|-----|---|
| 12. | <p>Welche Zahnbürste benutzt Ihr Kind in der Regel?</p> <p><input type="checkbox"/> elektrische Zahnbürste</p> <p><input type="checkbox"/> manuelle (Hand-)Zahnbürste</p> |
| 13. | <p>Wie oft wechseln Sie in der Regel die Zahnbürste Ihres Kindes?</p> <p><input type="checkbox"/> Jede Woche</p> <p><input type="checkbox"/> Alle 2-3 Wochen</p> <p><input type="checkbox"/> Alle 4-5 Wochen</p> <p><input type="checkbox"/> Alle 6-7 Wochen</p> <p><input type="checkbox"/> Seltener als alle 8 Wochen</p> |
| 14. | <p>Welche Zahnpasta benutzt Ihr Kind momentan?</p> <p><input type="checkbox"/> Erwachsenenzahnpasta</p> <p><input type="checkbox"/> Kinderzahnpasta</p> <p><input type="checkbox"/> Fluoridfreie Zahnpasta</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> <p><input type="checkbox"/> Andere: _____</p> |
| 15. | <p>Spült Ihr Kind in der Regel nach dem Zähneputzen mit Wasser nach?</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja</p> |
| 16. | <p>Benutzt Ihr Kind eine Mundspülung? Wenn Ja, welche und wie oft?</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, zusätzlich zum Zähneputzen</p> <p>Welche ist es?</p> <p>Wie oft?am Tag und.....Mal pro Woche</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, als Ersatz zum Zähneputzen</p> <p>Welche ist es?</p> <p>Wie oft?am Tag und.....Mal pro Woche</p> |
| 17. | <p>Wie oft putzt Ihr Kind in der Kita die Zähne?</p> <p>_____ Mal → bei 0 Mal weiter zu Frage 19</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |

| | |
|-----|---|
| 18. | <p>Wie lange putzt Ihr Kind in der Kita die Zähne?</p> <p><input type="checkbox"/> Weniger als 1 Minute</p> <p><input type="checkbox"/> 1 Minute</p> <p><input type="checkbox"/> 2 Minuten</p> <p><input type="checkbox"/> 3 Minuten</p> <p><input type="checkbox"/> 4 Minuten</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> |
| 19. | <p>19 a)</p> <p>Bekommt Ihr Kind aktuell Tabletten, die das Zahnwachstum unterstützen sollen? Wenn ja, wie oft?</p> <p><input type="checkbox"/> Nein → Weiter mit Frage 20</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, etwa.....Mal in der Woche</p> <p>19 b)</p> <p>Welche Tabletten waren das?</p> <p><input type="checkbox"/> Fluoridtabletten</p> <p><input type="checkbox"/> Vitamin D-Tabletten</p> <p><input type="checkbox"/> Fluorid-Vitamin D- Kombination</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> <p><input type="checkbox"/> Andere:_____</p> |
| 20. | <p>20 a)</p> <p>Hat Ihr Kind in der Vergangenheit Tabletten bekommen, die das Zahnwachstum unterstützen sollten? Wenn Ja, geben Sie bitte das Alter an in den Ihr Kind die Tabletten bekommen hat.</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, etwa von_____bis_____Jahre</p> <p>20 b)</p> <p>Welche Tabletten waren das?</p> <p><input type="checkbox"/> Fluoridtabletten</p> <p><input type="checkbox"/> Vitamin D-Tabletten</p> <p><input type="checkbox"/> Fluorid-Vitamin D- Kombination</p> <p><input type="checkbox"/> Weiß nicht</p> <p><input type="checkbox"/> Andere:_____</p> |

21.

Was trinkt Ihr Kind **aktuell** und wie häufig?

| | Mehrmals pro Tag | 1-2x pro Tag | 3-6x pro Woche | 1-2x pro Woche | Seltener als 1x pro Woche | Nie |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| Leitungswasser (ungekocht) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Gekochtes Wasser oder Mineralwasser | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Fruchtsäfte, Biosäfte | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Eistee | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Softdrinks (z. B. Cola) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Gesüßten Tee | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Kakao | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Anderes:..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

22.

Welche Getränke hat Ihr Kind **regelmäßig** aus einer Saugflasche getrunken, bzw. trinkt Ihr Kind noch aktuell **regelmäßig** aus einer Flasche mit Mundstück?

Saugflaschen sind etwa: Babyflasche/Nuckelflasche, Trinklernflasche, Sportflasche (z. B. SIGG-Flasche), andersartige Flasche mit einem Mundstück

| | Bis zum 1. Lebensjahr | Ab dem 1. Lebensjahr | Jetzt |
|------------------------------------|--------------------------|----------------------|-------|
| Leitungswasser (ungekocht) | | | |
| Gekochtes Wasser, Mineralwasser | | | |
| Muttermilch | | | |
| Ersatzmilch, Kuhmilch | | | |
| Fruchtsäfte | | | |
| Eistee | | | |
| Softdrinks (z. B. Cola) | | | |
| Gesüßten Tee | | | |
| Kakao | | | |
| Anderes:..... | | | |

| 23. | <p>Trinkt Ihr Kind abends nach dem Zähneputzen andere Getränke außer Wasser?</p> <p><input type="checkbox"/> Immer</p> <p><input type="checkbox"/> Manchmal</p> <p><input type="checkbox"/> Selten</p> <p><input type="checkbox"/> Nie</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|-----|----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 24. | <p>Trinkt Ihr Kind abends nach dem Zähneputzen aus Flaschen mit einem Mundstück?</p> <table border="1" data-bbox="263 604 1329 1323"> <thead> <tr> <th></th> <th>Immer</th> <th>Manchmal</th> <th>Selten</th> <th>Nie</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Leitungswasser (ungekocht)</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Gekochtes Wasser oder Mineralwasser</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Fruchtsäfte, Biosäfte</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Eistee</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Softdrinks (z. B. Cola)</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Gesüßten Tee</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Kakao, Milch mit Honig</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Anderes:.....</td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </tbody> </table> | | Immer | Manchmal | Selten | Nie | Leitungswasser (ungekocht) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Gekochtes Wasser oder Mineralwasser | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Fruchtsäfte, Biosäfte | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Eistee | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Softdrinks (z. B. Cola) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Gesüßten Tee | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Kakao, Milch mit Honig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | Anderes:..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| | Immer | Manchmal | Selten | Nie | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leitungswasser (ungekocht) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gekochtes Wasser oder Mineralwasser | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fruchtsäfte, Biosäfte | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Eistee | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Softdrinks (z. B. Cola) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gesüßten Tee | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Kakao, Milch mit Honig | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Anderes:..... | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | |
|-----|---|-----------------------|------------------|-------------------|-----------------------------|------------------------|
| 25. | Wie stehen Sie zu folgenden Aussagen? | | | | | |
| | | Stimme voll zu | Stimme zu | Weiß nicht | Stimme eher nicht zu | Stimme nicht zu |
| | Ich gebe meinem Kind bewusst Süßigkeiten vor dem Essen, weil dann der Zucker nicht so lange an den Zähnen verweilen kann. | | | | | |
| | Ich gebe meinem Kind Süßigkeiten, die nicht lange an den Zähnen kleben bleiben können (Kuchen oder Schokolade). | | | | | |
| | Es ist egal, welche Süßigkeiten mein Kind bekommt, alle sind gleich schlecht für die Zähne. | | | | | |
| | Anstelle von Süßigkeiten bekommt mein Kind Fruchtsäfte oder andere süße Getränke. | | | | | |
| | Ich gebe meinem Kind als Ersatz für Süßigkeiten weiches Obst (Rosinen, Datteln, etc.). | | | | | |
| | Mein Kind darf alles essen, so lange es sich vernünftig die Zähne putzt. | | | | | |
| | Mein Kind mag keine Süßigkeiten. | | | | | |

26.

Wie oft hat Ihr Kind in der Vergangenheit folgende Nahrungsmittel gegessen und wie oft isst Ihr Kind die folgenden Nahrungsmittel noch heute?

26 a) *Alter Ihres Kindes: 0-1 Jahre*

| | Nie | Einmal die Woche | Mehrmals die Woche | Täglich | Mehrmals am Tag |
|---|-----|------------------|--------------------|---------|-----------------|
| Obst | | | | | |
| Gemüse | | | | | |
| Vollkornbrot | | | | | |
| Weißbrot | | | | | |
| Honig, Schokoaufstrich, Marmelade | | | | | |
| Joghurt | | | | | |
| Weingummi, Kaubonbons | | | | | |
| Lutscher, Bonbons | | | | | |
| Schokolade | | | | | |
| Eis | | | | | |
| Müsli | | | | | |

26 b) *Alter Ihres Kindes: 1-3 Jahre*

| | Nie | Einmal die Woche | Mehrmals die Woche | Täglich | Mehrmals am Tag |
|---|-----|------------------|--------------------|---------|-----------------|
| Obst | | | | | |
| Gemüse | | | | | |
| Vollkornbrot | | | | | |
| Weißbrot | | | | | |
| Honig, Schokoaufstrich, Marmelade | | | | | |
| Joghurt | | | | | |
| Weingummi, Kaubonbons | | | | | |

| | | Nie | Einmal die Woche | Mehrmals die Woche | Täglich | Mehrmals am Tag |
|--|---|-----|------------------|--------------------|---------|-----------------|
| | Lutscher, Bonbons | | | | | |
| | Schokolade | | | | | |
| | Eis | | | | | |
| | Müsli | | | | | |
| <p>26 c) <i>Alter Ihres Kindes: 3 Jahre bis jetzt</i></p> | | | | | | |
| | | Nie | Einmal die Woche | Mehrmals die Woche | Täglich | Mehrmals am Tag |
| | Obst | | | | | |
| | Gemüse | | | | | |
| | Vollkornbrot | | | | | |
| | Weißbrot | | | | | |
| | Honig, Schokoaufstrich, Marmelade | | | | | |
| | Joghurt | | | | | |
| | Weingummi, Kaubonbons | | | | | |
| | Lutscher, Bonbons | | | | | |
| | Schokolade | | | | | |
| | Eis | | | | | |
| | Müsli | | | | | |
| 27. | <p>Hatte Ihr Kind innerhalb der letzten drei Monate eine Antibiotikabehandlung? Ein Antibiotikum wird bei Infektionen mit Keinem verschrieben. Hierzu gehören Krankheiten wie z.B. eine Mandelentzündung oder eine Lungenentzündung. Bitte geben Sie, sofern bekannt, den Namen des Antibiotikums an.</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, das Antibiotikum hieß.....</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> | | | | | |



**Medizinische Hochschule
Hannover**

MHH Ethikkommission OE 9515
30623 Hannover

Herrn
Prof. Dr. Rafael Mikolajczyk, MSc
AG Epidemiologische und Statistische Methoden (ESME)
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI)
Inhoffenstr. 7
38124 Braunschweig

**Ethikkommission
Vorsitzender:
Prof. Dr. H. D. Tröger**

Sekretariat:
Rita Landowski
Telefon: 0511 532-3443
Fax: 0511 532-5423
ethikkommission@mh-hannover.de

Carl-Neuberg-Straße 1
30625 Hannover
Telefon: 0511 532-0
www.mh-hannover.de

03.09.14/La

**KraKi – Eine Studie zur Vorbeugung von Infektionskrankheiten bei Kindern
Nr. 2380-2014**

Sehr geehrter Herr Kollege Mikolajczyk,

als Vorsitzender habe ich im Auftrag der Mitglieder der Ethikkommission Ihr Schreiben vom 02.09.14 und die Ausführungen zum o. g. Vorhaben geprüft. Es bestehen keine ethisch-rechtlichen Bedenken gegenüber dem geplanten Vorhaben.

Mit besten Grüßen bin ich
Ihr

Prof. Dr. H. D. Tröger
Vorsitzender

Ludwig-Maximilians-Universität München
Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
(Direktor: Prof. Dr. R. Hickel)

**Antrag an die Ethikkommission
der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

„Analyse des Transkriptoms aus kariösen Läsionen bei Kindern mit
frühkindlicher Karies unter besonderer Berücksichtigung der Interaktion
zwischen *Streptococcus mutans* und *Candida albicans*“

2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| 1 | Antragsteller |
| 2 | Titel des Forschungsvorhabens |
| 3 | Ausbildungsdaten und Prüferfahrung des Antragstellers |
| 4 | Monozentrische oder multizentrische Studie |
| 5 | Abgeschlossener Versicherungsschutz für Probanden |
| 6 | Berücksichtigung der Grundsätze der Deklaration von Helsinki |
| 7 | Bei Arzneimittelprüfungen: Trifft nicht zu |
| 8 | Bei rein studienbedingten Strahlenbelastungen: Trifft nicht zu |
| 9 | Wissenschaftliche Angaben zum Forschungsvorhaben |
| 9.1 | Ziel der Studie |
| 9.2 | Art und Design der Studie |
| 2.2.1 | Probanden |
| 9.2.2 | Einschlusskriterien |
| 9.2.3 | Ausschlusskriterien |
| 9.2.4 | Methode |
| 10 | Diskussion der ethisch-rechtlich relevanten Probleme |
| 10.1 | Diskussion der Nachteile, Risiken, Belastungen und des möglichen Nutzens der Studie |
| 10.2 | Forschung an Minderjährigen |
| 10.3 | Dokumentation / Datenschutz |
| 10.4 | Patienteninformation und Einverständniserklärung |
| 10.5 | Vorgehen bei schweren Zwischenfällen und Nebenwirkungen |
| 10.6 | Abbruchkriterien |
| 11 | Änderungen des Prüfprotokolles |
| 12 | Finanzierung des Projektes |
| 13 | Elterninformation und Einverständniserklärung |

1. Antragsteller

Als leitende Einrichtung fungiert die Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München (Direktor: Prof. Dr. R. Hickel). Als Projektleiter ist Herr OA PD Dr. J. Kühnisch eingesetzt. Dr. Jan Pfisterer und Dr. Katharina Bücher sind als Zahnärzte im Funktionsbereich Kinderzahnheilkunde tätig und werden als weitere Studienärzte fungieren.

Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Ludwig-Maximilians-Universität
Goethestraße 70, 80336 München
Telefon 089/ 4400 59343
Fax 089/ 4400 59349
Email jkuehn@dent.med.uni-muenchen.de
jpfigsterer@dent.med.uni-muenchen.de

Als kooperierender Projektpartner fungiert die Arbeitsgruppe Mikrobielle Kommunikation unter der Leitung von Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Herr Frederic Meyer (M.Sc. Biologie) ist für die Projektdurchführung der mikrobiologischen Analysen verantwortlich.

Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
AG Mikrobielle Kommunikation
Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig
Telefon 0531/ 6181 3080
Fax 0531/ 6181 3096
Email: Irene.wagner-doebler@helmholtz-hzi.de
Frederic.Meyer@Helmholtz-HZI.de

2. Titel des Forschungsvorhabens

„Analyse des Transkriptoms aus kavitierten, kariösen Läsionen unter besonderer Berücksichtigung der Interaktion zwischen *Streptococcus mutans* und *Candida albicans*“

3. Ausbildungsdaten und Prüferfahrung des Studienleiters

Der Studienleiter, OA PD Dr. Jan Kühnisch, ist seit 2003 Spezialist im Fachgebiet der Kinder- und Jugendzahnheilkunde und seit 2004 an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München tätig. Im Jahr 2007 erfolgte die Ernennung zum Oberarzt im Bereich der Kinder- und Jugendzahnheilkunde. Dr. Jan Kühnisch ist seit 2008 habilitiert. Gemeinsam mit Prof. Dr. R. Hickel, der seit 1992 Ordinarius und Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München ist, wurden bisher etliche Ethikanträge zu klinischen Studien gestellt und die Studienvorhaben anschließend umgesetzt. In der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie ist eine umfangreiche Forschungstätigkeit etabliert, deren Ergebnisse kontinuierlich publiziert werden. PD Dr. Jan Kühnisch ist als Prüfarzt qualifiziert.

Dr. Jan Pfisterer (Zahnarzt, Facharzt für Kinder- und Jugendheilkunde) ist seit April 2014 in der Abteilung für Kinder- und Jugendzahnheilkunde an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität München tätig. Zuvor war er als Kinderarzt für 5 Jahre am Klinikum Stuttgart und 2 Jahre als Prüfarzt für klinische Studien in München tätig. Sein aktueller Forschungsschwerpunkt liegt auf der Kariesrisikoanalyse bei Kindern mittels spezifischem Nachweis von *Streptococcus mutans* durch monoklonale Antikörper im Speichel.

Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler ist seit 1985 am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig (früher Gesellschaft für Biotechnologische Forschung) tätig und ist seit 2001 habilitiert in dem Fachbereich der Mikrobiologie. Seit 2004 ist sie Leiterin einer eigenen Arbeitsgruppe und 2007 wurde sie zur Professorin der TU Braunschweig ernannt. Sie forscht seit mehreren Jahren an dem Mundbakterium *Streptococcus mutans* und publiziert die Ergebnisse regelmäßig.

Zuletzt erschienen ist 2014 eine wissenschaftliche Arbeit, die die Interaktion zwischen *S. mutans* und *C. albicans in vitro* näher beleuchtet. Die geplante Studie ist die Fortsetzung selbiger *in vivo*.

Frederic Meyer (M.Sc. Biologie/ Mikrobiologie und Infektionsbiologie), ist seit Juni 2014 PhD-Student in der Arbeitsgruppe „Mikrobielle Kommunikation“ unter der Leitung von Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler am HZI in Braunschweig. Er studierte Biologie mit den Schwerpunkten Mikrobiologie und Infektionsbiologie an der TU Braunschweig. Seine Masterarbeit befasste sich mit dem Transkriptom von *S. mutans*. Sein Schwerpunkt liegt nun auf der Mikrobiomanalyse bei Kindern mit frühkindlicher Karies.

4. Monozentrische oder multizentrische Studie

Bei der geplanten Studie handelt es sich um eine monozentrische, prospektiv geplante Fall-Kontroll-Studie unter Einbeziehung von bis zu 6-jährigen Kindern. Da es sich bei der frühkindlichen Karies um eine eigene Entität handelt, welche durch eine hohe Kariesaktivität, einen u.U. auf die gesamte Dentition verteilten Kariesbefall sowie weit in das Dentin fortgeschrittene kariöse Läsionen charakterisiert ist, sind Studien zur Ätiologie und Pathogenese dieses Zustandsbildes erforderlich. *Per definitionem* der American Association of Paediatric Dentistry (AAPD, 2008) können von einer frühkindlichen Karies nur Kinder bis zum 6. Lebensjahr betroffen sein (1). Dies begründet die ausschließliche Berücksichtigung von Kleinkindern in der vorliegenden Studie.

Des Weiteren ist auszuführen, dass das Studienziel auf die Identifikation des Mikrobioms in kariösen Läsionen bei Kindern mit frühkindlicher Karies ausgerichtet ist, um Rückschlüsse über typische mikrobielle Zusammensetzungen und Interaktionen zu erhalten. Dies Studienziel wird über die einfache Entnahme von Abstrichen realisiert. Die einzuschließenden Patienten bzw. Zähne bedürfen der Sanierung und werden einer Kariestherapie an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie unterzogen. Die für das Erreichen des Studienzieles notwendige Entnahme von Abstrichen ist ohne relevanten Mehraufwand umsetzbar. Pro Probenentnahme sind dafür ca. 30 bis 60 Sekunden Zeitaufwand zu veranschlagen.

5. Abgeschlossener Versicherungsschutz für Probanden

Da die Zahnsanierung der Kinder ohnehin durchgeführt werden muss und bei der Entnahme der mikrobiologischen Abstriche keinerlei Gesundheitsrisiken bestehen, wird eine zusätzliche Probandenversicherung im Rahmen der Studie nicht abgeschlossen. Alle eingesetzten zahnärztlichen Verfahren sind als Standardverfahren der alltäglichen Routinebehandlung einzustufen. Schäden, die aus der Anwendung dieser Verfahren entstehen, sind deshalb, wie bei allen Klinikpatienten, durch den Dienstherrn der ausführenden Zahnärzte abgesichert.

6. Berücksichtigung der Grundsätze der Deklaration von Helsinki

Die Planung, Durchführung und Auswertung der Studie zur „Analyse des Transkriptoms aus kavitierten, kariösen Läsionen unter besonderer Berücksichtigung der Interaktion zwischen *Streptococcus mutans* und *Candida albicans*“ wird unter strikter Beachtung der Grundsätze der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki (1964) mit ihren Novellierungen von Hong Kong (1989), Somerset West (1996), Edinburgh (2000) und der neuesten Revision von Seoul (2008) vorgenommen.

Wir erklären, dass die Grundsätze der Deklaration von Helsinki in der derzeit gültigen Fassung berücksichtigt wurden.

München, den im Dezember 2014

OA PD Dr. Jan Kühnisch

Jan Pfisterer

Prof. Dr. Irene Wagner-Döbler

Frederic Meyer

7. Bei Arzneimittelprüfungen

Trifft nicht zu.

8. Studienbedingte Strahlenbelastung

Trifft nicht zu.

9. Wissenschaftliche Angaben zum Forschungsvorhaben

9.1 Hintergrund und Ziel der Studie

Hintergrund der Untersuchung ist, dass das Problem der frühkindlichen Karies nach wie vor nicht gelöst ist und in einer Häufigkeit von bis zu 10% im Kleinkindalter und bis 20-50% (definitions- und altersabhängig) im Vorschulalter aufgefunden werden kann.

Typisches Erscheinungsbild der frühkindlichen Karies bei einem 4-Jährigen. Deutlich zu erkennen sind kariös destruierten oberen Front- und Eckzähne.



Mit dem Ziel der Vermeidung dieses Problems bedarf es jedoch grundlegender Information über die Entstehung und die Ursachen für das schnelle Voranschreiten kariöser Läsionen im Kleinkindalter. Eine Schlüsselrolle spielen dabei säureproduzierende Mikroorganismen, wobei Streptokokken hier als vordergründige Spezies genannt werden müssen. Allerdings zeichnet sich hier durch die Verfügbarkeit neuer molekulargenetischer Methoden die Notwendigkeit einer aktualisierten Standortbestimmung ab.

Hauptziel der Studie ist es daher, die mikrobiologische Ursachen, welche zur Initiation und Progression der frühkindlichen Karies führen, zu untersuchen. Neben der Erfassung aller vorkommenden Mikroorganismen (Mikrobiota) bzw. mikrobiellen DNA

wird zusätzlich das Transkriptom (Gesamtheit der mikrobiellen messenger-RNA) mit Hilfe der Deep-Sequencing-/ Next-Generation-Sequencing-Technologie ausgewertet werden. Mit diesem Methodenansatz ist es möglich, qualitative und quantitative Aussagen über die Gesamtheit aller spezifisch bei Kindern mit frühkindlicher Karies vorkommenden Mikroorganismen zu erhalten. Darüber hinaus sind Rückschlüsse dahingehend zu erwarten, welche Mikroorganismen über hohe Reproduktionsraten – messbar an der Quantität der spezies-spezifischen m-RNA – verfügen und somit die Aktivität des kariösen Prozesses fördern.

Als weiteres Studienziel wird die Interaktionen zwischen *Streptococcus mutans*-Bakterien und dem Pilz *Candida albicans* zu evaluieren sein. Das Vorkommen und die Häufigkeit von *Streptococcus mutans* ist in der Kariesätiologie als ein wichtiger Faktor bestätigt (2, 3). Jüngste Biofilm-Studien zeigten ergänzend dazu, dass der Auslöser für Karies nicht auf bakterieller Seite, sondern vielmehr in der Interaktion zwischen Bakterium und Pilz zu suchen ist (4). Diese Studie zeigt, dass *S. mutans* und *C. albicans* bei gemeinsamer Kultivierung stets zusammen vorzufinden sind. *S. mutans* ist hierbei an den Hyphen des Pilzes *C. albicans* ohne die sonst typische extrazelluläre polymere Substanz (EPS) zu finden. Die EPS dient normalerweise als Schutz gegen weitere Umweltfaktoren (wie etwa Säuren oder andere Bakterien). Da diese Interaktionen gegenwärtig aus klinischer Sicht wenig betrachtet sind, ist ein weiterer Studienbedarf hier unbestritten. Dies rechtfertigt sich auch aus der Perspektive heraus, mit diesen Informationen präventiv Einfluss auf das Kariesgeschehen nehmen zu können. Es sind bisher keine Studien vorliegend, die das Mikrobiom in dieser Tiefe beleuchtet haben. Lediglich Kultivierungsstudien oder aber Studien, die ausschließlich die bakterielle Zusammensetzung betrachten sind vorhanden. Keine dieser Studien behandelt das Transkriptom oder die Mikrobiota mit diesen geplanten Techniken und Methoden (5-7).

9.2 Studiendesign

Die geplante Studie setzt sich im Wesentlichen aus einem klinischen Untersuchungsabschnitt an der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie/ Funktionsbereich Kinderzahnheilkunde und einem nachfolgenden Laborabschnitt am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig/ Arbeitsgruppe Mikrobielle Kommunikation zusammen.

9.2.1 Klinischer Untersuchungsabschnitt

Probanden. Der klinische Untersuchungsteil wird an der Zahnklinik der Ludwig-Maximilian-Universität in München durchgeführt. Dazu sollen Kinder, welche nicht älter als 6 Jahre sind, eine frühkindliche Karies aufweisen und eine Gebissanierung im Funktionsbereich der Kinder-und Jugendzahnheilkunde wünschen in die Untersuchung eingeschlossen werden. Die Sanierung findet kooperationsabhängig in Lokalanästhesie oder in Allgemeinanästhesie statt. Die nachgenannten patienten- und zahnbezogenen Ein- bzw. Ausschlusskriterien müssen erfüllt sein.

Einschlusskriterien

- Kinder mit einer frühkindlichen Karies mit mindestens einer vorhandenen, kavitierten kariösen Dentinläsion
- Alter < 6 Jahre
- Eltern wünschen eine Sanierung der kariösen Läsionen an der Poliklinik für Zahnerhaltung/ Funktionsbereich Kinderzahnheilkunde
- Die Eltern des Kindes willigen in die Studie ein; Unterschrift der Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien

- Kinder mit *nicht* kariös bedingten Zahnhartsubstanzdefekten oder Strukturstörungen der Zähne, z.B. Amelogenesis imperfecta, Dentinogenesis imperfecta o.ä.
- Keine kariös bedingten Kavitationen im Dentin vorhanden
- Alter > 6 Jahre
- Eltern wünschen keine Sanierung der kariösen Läsionen an der Poliklinik für Zahnerhaltung/ Funktionsbereich Kinderzahnheilkunde
- Eltern willigen nicht in die Teilnahme an dieser Studie ein; keine Unterschrift der Einverständniserklärung

Kontrollgruppe. Als Kontrollproben werden Abstriche von kariesfreien Zähnen des gleichen Patienten entnommen. Hierfür wird ein entsprechender Zahn aus der gleichen Kieferhälfte ausgewählt.

Erfassung von Basisinformation. Mit Patienteneinschluss werden Basisinformationen, wie das Alter am Tag der Probenentnahme, Geschlecht, Migrationshintergrund, Mundhygienestatus, das Vorhandensein von Black Stain, Kariesbefall (Indices nach WHO, 1997 und UniViSS 2011) und Typ der frühkindlichen Karies (Wyne 1999) erfasst. Zusätzlich werden kariesassoziierte Ernährungsweisen dokumentiert.

Mundhygienestatus. Der Plaquebefall als Ausdruck der aktuellen Mundhygiene-Situation erfolgt indem mit der CPI-Sonde (CP-11.5B6, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) entlang des Sulcus gingivae die Zahnoberfläche sondiert wird. Das kugelförmige Ende mit einem Durchmesser von 0,5 mm verläuft dabei im Sulkus gingivae. Die Dokumentation von (nicht) vorhandener Plaque wird als Ja/Nein-Entscheidung an allen Zähnen vorgenommen. Dabei handelt es sich um eine Routinevariable im Rahmen der Diagnostik und Therapie der frühkindlichen Karies an unserer Poliklinik, d.h. bei diesem Befund handelt es sich um keinen Befund, welcher ausschließlich für Studienzwecke erhoben werden würde.

Erfassung einer gingivalen Entzündung. Der Entzündungszustand der Gingiva wird als Sulkusblutung nach der bereits im vorherigen Schritt durchgeführten drucklosen Sondierung (CP-11.5B6, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) registriert. Tritt eine Blutung (nicht) auf, so wird dies als Ja/Nein-Entscheidung registriert. Dabei handelt es sich um eine Routinevariable, welche im Rahmen der Diagnostik und Therapie der frühkindlichen Karies erhoben wird. D.h., auch bei diesem Befund handelt es sich um keine Variable welche ausschließlich für die geplante Studie erhoben werden würde.

Erfassung des Kariesstatus. Der Kariesbefall wird im Rahmen der vorliegenden Untersuchung entsprechend den WHO-Kriterien (1997) und dem universellen visuellen Scoring System (UniViSS (8, 9) erfasst. Damit gelingt die Registrierung von nicht kavitierten kariösen Läsion und kariös bedingten Kavitationen. Aufgrund der Kompatibilität der Kriterien sind kariös bedingte Kavitationen (D-Komponente des DMF-Index) als auch die Kategorien des International Detection and Assessment System (ICDAS) (10) einfach aus den UniViSS-Befunden ableitbar. Darüber hinaus werden vorhandene Füllungen (F-Komponente des DMF-Index) und kariesbedingte Extraktionen dokumentiert (M-Komponente des DMF-Index). In der vorliegenden Untersuchung werden die Befunde zahnflächenbezogen ermittelt. Aus diesen Befunden kann der zahnbezogene Kariesbefall abgeleitet werden. Die Erfassung des Kariesstatus ist Grundlage für die Diagnostik, Therapieplanung und Behandlung von Kindern mit frühkindlicher Karies an unserer Poliklinik. Auch bei diesem Befund handelt

es sich um Informationen, welche im klinischen Alltag obligatorisch zu erheben sind und für die geplante Studie mit übernommen werden können.

Bei den eingeschlossenen Patienten mit frühkindlicher Karies sollen an den folgenden Lokalisationen mikrobiologische Abstriche entnommen werden:

- Speichel
- Zunge
- Kariesfreie Okklusal- oder Glattfläche
- Nicht-kavitierte Okklusal- oder Glattflächenkaries (Kariesvorstufe)
- Kavitierte, profunde Okklusal- oder Glattflächenkaries (Loch im Zahn)

Methodik des Abstriches. Die mikrobiologischen Abstriche werden mit Hilfe von sterilen Stäbchen (FloqSwabs, Copan, Italien; Regular, Sollbruchstelle 30mm) entnommen. Für die Gewinnung des Mikrobioms/ Transkriptoms wird mit dem Nylonbeschichteten Stäbchen auf der jeweiligen Oberfläche entlanggestrichen. Eine Kontamination des Stäbchens ist vor und nach der Probenentnahme zu vermeiden. Das Abstrichstäbchen wird anschließend in einem Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2,0 mL, Eppendorf Quality, farblos) mit RNA-Protect (Qiagen, RNAProtect Cell Reagent) eingelagert. Die gewonnenen Proben werden nach dem Behandlungsende bei -80° C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Die Probenröhrchen werden mit einem einmaligen Zahlen und/oder Buchstabencode versehen, so dass eine pseudonymisierte Zuordnung gelingt.

Der Schritt der mikrobiologischen Probengewinnung ist der einzige Arbeitsschritt, welcher zusätzlich zu den etablierten diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen am kindlichen Patienten erfolgt. Der Zeitbedarf ist insgesamt mit wenigen Minuten anzugeben.

9.2.2 Methodik der mikrobiologischen Probenaufbereitung

Ziel der molekulargenetischen Untersuchung ist die Sequenzierung des Mikrobioms und Transkriptoms, welches bei Kindern mit einer frühkindlichen Karies an Dentinläsionen aufgefunden wird. *Eine Sequenzierung humangenetischer Informationen wird nicht durchgeführt.*

Eigene Vorarbeiten und Expertise. In der Gruppe Mikrobielle Kommunikation (KOM) am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung sind die Labormethoden zur DNA-Extraktion aus mikrobiologischen Proben bereits seit vielen Jahren etabliert und werden stetig weiterentwickelt. Die Analyse von Mund- und Zahnproben wird ebenfalls seit mehreren Jahren durchgeführt. Es liegen bereits mehrere Publikationen aus der Arbeitsgruppe zu der Erforschung von Bakterien und Pilzen der Mundhöhle vor (4), welche zeigen, dass die Labormethoden beherrscht werden. Zudem sind noch nicht veröffentlichte Arbeiten zu dem Mikrobiom aus Parodontaltaschen akzeptiert, jedoch nicht abgedruckt. Ebenfalls konnte bereits in mehreren hausinternen Pilotstudien die Methoden und Techniken, die in dieser Studie verwendet werden sollen, getestet und verbessert werden. Das Wissen der Arbeitsgruppe Mikrobielle Interaktionen und Prozesse (MINP) unter der Leitung von Dietmar Pieper, ebenfalls am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig ansässig, wird für die Durchführung der Sequenzierung genutzt. Auch hierzu gibt es bereits entsprechende Publikationen (11). Damit liegt eine umfangreiche Expertise vor, oral mikrobiologische Proben zu bearbeiten.

Details der Labormethodik. Die klinischen Proben werden in einer Stabilisationslösung konserviert. Diese Stabilisationslösung trägt den Namen „RNA-Protect“ und konserviert sowohl die mikrobielle DNA und RNA. Im Labor werden die konservierten Proben derart behandelt, dass noch vorhandene Zellen zunächst lysiert werden und das gesamte genomische Material freigesetzt wird. Die Zelllyse läuft teilweise mechanisch und teilweise enzymatisch ab. Die mechanische Aufspaltung wird mit kleinen Glaskügelchen (sogenannten Beads) und einem Bead-Beater, auch Fast-Prep genannt, durchgeführt. Die Glaskügelchen sind Bestandteil des Lyse-Kits (FastDNA Spin Kit for Soil MP Biomedicals Solon OH USA cat 116560200). Ebenfalls enthalten in diesem Kit sind die chemischen/enzymatischen Lösungen, die für den Zellaufschluss verwendet werden. Anschließend kann hieraus die messenger RNA (mRNA) und die ribosomale 16S rDNA gewonnen werden.

Nach dem Zellaufschluss wird die erhaltene Flüssigkeit auf eine sogenannte Säule gegeben. Diese Säule bewirkt, dass die Nukleinsäuren an dieser hängen bleiben und alle anderen Zellbestandteile, die in der Flüssigkeit enthalten sind, verworfen, also entsorgt werden können. In einem abschließenden Schritt können die Nukleinsäuren mit einer weiteren Lösung dann von dieser Säule gelöst (eluiert) und in einem separaten Gefäß aufgefangen werden. Für die Analyse der bakteriellen Komposition

(Mikrobiota) werden Teile der 16S rDNA, die für die Analyse verwendet werden, vorher noch mit einer Polymerasekettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction/PCR) vervielfältigt, damit die Sequenzierung hiervon durchgeführt werden kann. Die gewonnen Nukleinsäuren für die Transkriptomanalyse werden direkt sequenziert. Hierfür stehen folgende Varianten zur Verfügung: Für die Transkriptomanalyse wird eine sogenannte HiSeq-Sequenziereinheit verwendet (Illumina, HiSeq 2000) und für die Analyse der bakteriellen Komposition eine sogenannte MySeq-Sequenziereinheit (Illumina, MySeq 2000). Die Unterschiede dieser beiden Sequenziereinheiten liegen in der Sensitivität und der hierfür benötigten Menge an Nukleinsäuren. So können auch kleinste Mengen an vorhandenen Basen identifiziert werden. Die Daten liegen anschließend in entsprechenden Formaten vor (FASTA-Format und Excel-Format). Folgende Abbildung (Abbildung 1) stellt schematisch die Arbeitsschritte im Labor dar.

9.2.6 Statistik

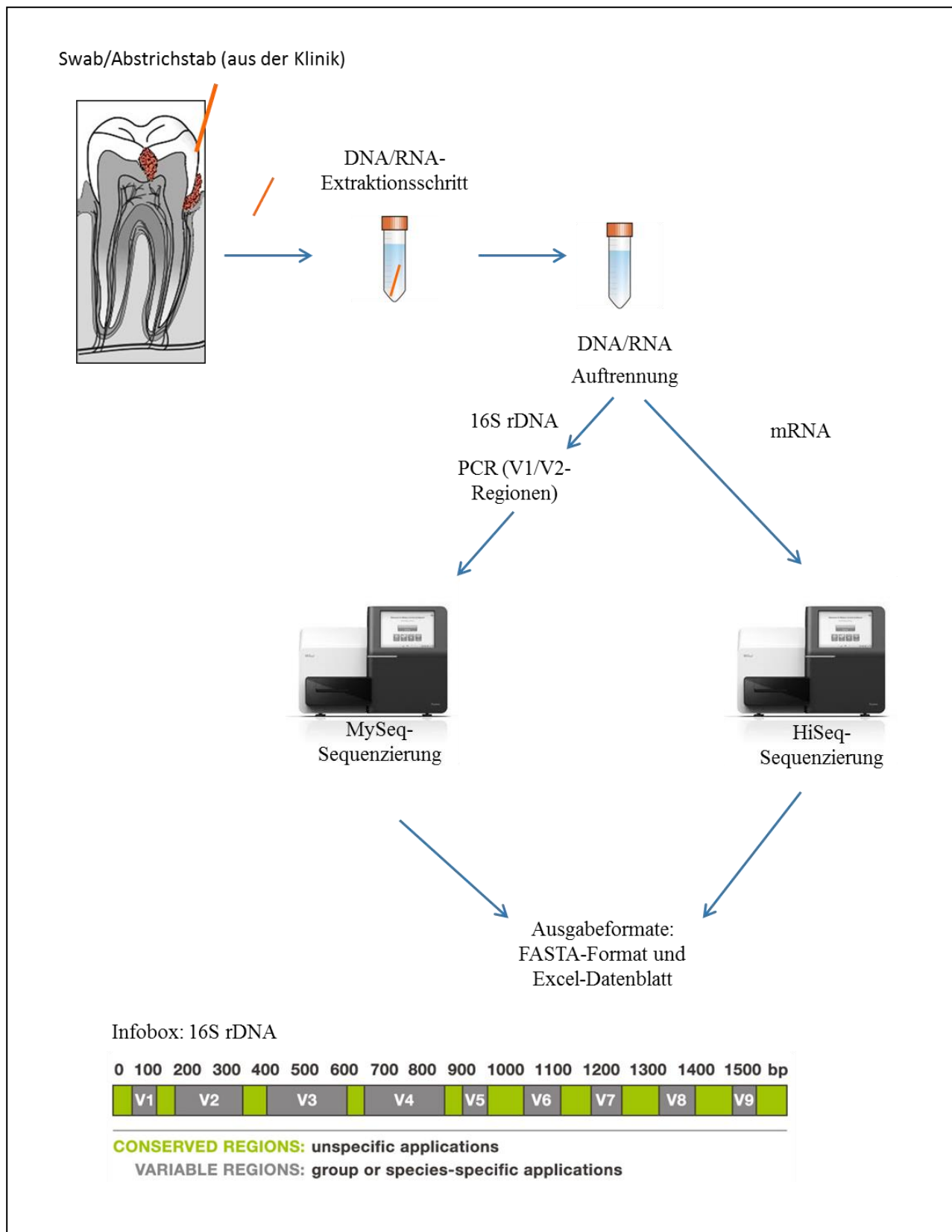
Fallzahlplanung. Es wird angenommen, dass sich ein Gen signifikant verändert im Vergleich Karies und Kariesfreiheit. Mit einer angenommenen Wahrscheinlichkeit von 60% wird sich dieses Gen tatsächlich verändern. Es werden 30 Proben benötigt, damit eine Power von 0,996 für die oben genannten Kriterien erreicht werden kann.

Tabelle 1: Stichprobengröße und Power bei einer 60% Wahrscheinlichkeit, dass sich ein Gen verändert bei Patienten mit und Patienten ohne Karies.

| Stichprobengröße | Gen erhöht | Gen unverändert | Power |
|------------------|------------|-----------------|-------|
| 10 | 6 | 4 | 0,143 |
| 20 | 12 | 8 | 0,716 |
| 30 | 18 | 12 | 0,996 |

Statische Datenaufbereitung. Die vorliegenden Sequenzen werden mit entsprechenden Datenbanken bzw. Datensätzen abgeglichen. Für die Mikrobiota-Analyse wird die HOMD-Datenbank (<http://www.homd.org/>) verwendet und zusätzlich noch der RDP-Classifer (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>). Beide sind online verfügbar. Für die Transkriptomanalyse werden die Sequenzen mit den kompletten Genomen von *S. mutans* und *C. albicans* abgeglichen. Die Genome können in der aktuellsten verfügbaren Version von der KEGG-Datenbank (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) heruntergeladen werden. Zur statistischen Analyse werden sowohl Excel als auch Programme des R-Paketes verwendet.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Arbeitsprozesses zur Aufbereitung der mikrobiellen messenger RNA (mRNA) und die ribosomale 16S rDNA



10. Diskussion der ethisch-rechtlich relevanten Probleme

10.1 Diskussion der Nachteile, Risiken, Belastungen und des möglichen Nutzens der Studie

Der wesentliche Nutzen der Studie liegt in der Erforschung und dem verbesserten Verstehen der mikrobiologischen Ursachen für das Auftreten einer frühkindlichen Karies. Hieraus abgeleitete Fernziele sind die Verbesserung der Krankenversorgung durch gezielte Früherkennung eines Kariesrisikopatienten oder Kindes mit frühkindlicher Karies.

Da in der Studiengruppe lediglich Abstriche von kariesfreien, initial kariös veränderten Zahnflächen und kariösen Defekten entnommen werden, entstehen für den Patienten keine studienbedingten Nachteile, Belastungen oder Risiken.

10.2 Forschung an Minderjährigen

Die Einbeziehung von Minderjährigen begründet sich darin, dass die frühkindliche Karies ausschließlich an den Milchzähnen und definitionsgemäß bei Kindern bis zum sechsten Lebensjahr auftritt. Demzufolge müssen allen Studien, welche den Aspekt der der frühkindlichen Karies untersuchen in dieser Altersgruppe durchgeführt werden. Dies begründet die ausschließliche Einbeziehung von Klein- und Vorschulkindern in das Studienkonzept. Es liegen noch keine derartigen Studien zu dieser Thematik vor. Weder das typische Mikrobiom der frühkindlichen Karies wurde mit den neuesten Sequenziertechniken untersucht, noch wurden das Transkriptom und die Interaktion zwischen Bakterien und Pilzen näher erforscht.

Da die Probanden allesamt minderjährig sind, ist eine Teilnahme an der Studie selbstverständlich nur mit dem Einverständnis der Eltern bzw. des gesetzlichen Vertreters möglich. Der den Patienten, bzw. dem gesetzlichen Vertreter vor der Entscheidung über Zustimmung/Ablehnung der Teilnahme an der Studie ausgehändigte Aufklärungsbogen ist dem Antrag als Anlage (Anlage 2) beigelegt. Auf eine kindgerechte Version wurde verzichtet.

Die Kontaktaufnahme erfolgt folgendermaßen:

Die Eltern bzw. gesetzliche Vertreter von Kindern mit einer frühkindlichen Karies werden bei der Erstkonsultation oder einem Folgetermin in der Poliklinik für

Zahnerhaltung und Parodontologie angesprochen und über das Studienziel informiert. Bei positivem Interesse umfasst die Aufklärung folgende Aspekte:

- (a) mündliche Aufklärung über die mögliche Teilnahme an der Studie, sowie Ziel, Vor- und Nachteile, Pseudonymisierung, Weitergabe- und Auswertungsweise der Daten.
- (b) Einholung des schriftlichen Einverständnisses.
- (c) Für die Minderjährigen entstehen keinerlei studienbedingten Belastungen oder Risiken.

10.3 Dokumentation und Datenschutz

Der Datensatz mit den klinischen Informationen wird am Studienstandort in München nach den geltenden Datenschutzbestimmungen erstellt und gespeichert. Die Daten werden nur in pseudonymisierter Form unter Zuordnung eines zufälligen Zahlen-/Buchstabencodes verwendet. Zugang zum Verschlüsselungscode hat ausschließlich der Studienleiter (OA PD Dr. Jan Kühnisch). Eine Dekodierung ist nur im Fall der Schadensabwendung vom Patienten vorgesehen, etwa wenn pathologische Befunde festgestellt werden, deren Behandlung sichergestellt werden muss oder im Falle des Widerrufs seitens der Eltern des Patienten für die Durchführung einer Löschung.

Die pseudonomisierten Abstriche werden bis zur geplanten Aufbereitung in Gefriertruhen der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie in München fachgerecht gelagert und anschließend postalisch oder per Kurier nach Braunschweig an das HZI versandt, wo sie ebenfalls in gesicherten Kühltruhen gelagert und im Labor weiterverarbeitet werden. Die im Rahmen der Auswertungen erhobenen Daten werden am HZI in Braunschweig erstellt und gespeichert.

Für die statistischen Auswertungen haben beide Kooperationspartner bzw. die berechtigten Personen Zugriff auf beide Datensätze, um die notwendigen deskriptiven und explorativen Analysen durchzuführen. Die Datenschutzbestimmungen werden eingehalten (Zugriff erhalten nur berechnigte Personen, Kennwortschutz der genutzten PC's etc).

In Anlage 2 befindet sich der Patientenaufklärungsbogen mit den oben genannten Ausführungen zum Datenschutz sowie einer datenschutzrechtlichen Einwilligungserklärung.

10.5 Abbruchkriterien

Als Abbruchkriterium gilt die fehlende Kooperation des Patienten. Als weiteres Abbruchkriterium gilt das Ausscheiden eines Patienten aus der Studie auf eigenen Wunsch, wobei der Patient selbstverständlich *lege artis* an der Poliklinik weiterbehandelt wird.

Der Abbruch wird mit Datum auf dem Dokumentationsbogen festgehalten. Der Dokumentationsbogen wird nach Unterzeichnung durch den Zahnarzt dem Studienleiter zugeleitet und archiviert und die bis dahin gewonnenen Daten verwendet.

10.6 Vorgehen bei schweren Zwischenfällen und Nebenwirkungen

Schwere Zwischenfälle bzw. Nebenwirkungen sind Ereignisse, die sicher, wahrscheinlich oder möglicherweise im Zusammenhang mit der im Rahmen der Studie vorgenommenen Untersuchungen auftreten und eine schwere oder bleibende gesundheitliche Beeinträchtigung des Patienten hervorrufen können oder tatsächlich verursacht haben. Als schwere Zwischenfälle bzw. Nebenwirkungen sind insbesondere alle Ereignisse anzusehen, die eine stationäre klinische Behandlung des Patienten erfordern, die Gefahr einer Behinderung verursachen können oder mit Lebensgefahr für den Patienten einhergehen. Alle schweren Zwischenfälle bzw. Nebenwirkungen müssen durch den betreffenden Zahnarzt unverzüglich dem Studienleiter gemeldet werden.

Da es sich bei der geplanten Untersuchung lediglich um eine Diagnostikstudie handelt und keine invasiven Behandlungen durchgeführt werden, sind Zwischenfälle nicht zu erwarten. Alle verwendeten Materialien befinden sich in alltäglicher klinischer Anwendung und sind ausreichend auf Biokompatibilität getestet. Alle schwerwiegenden oder unerwarteten Ereignisse im Rahmen der Studie werden der Ethikkommission mitgeteilt.

11. Änderungen des Prüfprotokolls

Sämtliche Änderungen des Prüfprotokolls werden ebenfalls der Ethikkommission mitgeteilt

12. Finanzierung

Die Studie wird von den beiden kooperierenden Partnern aus abteilungseigenen Mitteln finanziert. Eine Honorierung von Patienten oder Prüfern ist nicht vorgesehen.

Referenzen

1. A. A. o. P. Dentistry, Definition of Early Childhood Caries. (2008).
2. T. M. Parisotto, C. Steiner-Oliveira, C. M. Silva, L. K. Rodrigues, M. Nobre-dos-Santos, Early childhood caries and mutans streptococci: a systematic review. *Oral health & preventive dentistry* **8**, 59-70 (2010).
3. A. C. Tanner, J. M. Mathney, R. L. Kent, N. I. Chalmers, C. V. Hughes, C. Y. Loo, N. Pradhan, E. Kanasi, J. Hwang, M. A. Dahlan, E. Papadopolou, F. E. Dewhirst, Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *Journal of clinical microbiology* **49**, 1464-1474 (2011); published online EpubApr (10.1128/JCM.02427-10).
4. H. Sztajer, S. P. Szafranski, J. Tomasch, M. Reck, M. Nimtz, M. Rohde, I. Wagner-Dobler, Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *The ISME journal*, (2014); published online EpubMay 13 (10.1038/ismej.2014.73).
5. W. Jiang, J. Zhang, H. Chen, Pyrosequencing analysis of oral microbiota in children with severe early childhood dental caries. *Current microbiology* **67**, 537-542 (2013); published online EpubNov (10.1007/s00284-013-0393-7).
6. T. Klinke, M. Urban, C. Luck, C. Hannig, M. Kuhn, N. Kramer, Changes in *Candida* spp., mutans streptococci and lactobacilli following treatment of early childhood caries: a 1-year follow-up. *Caries research* **48**, 24-31 (2014)10.1159/000351673).
7. X. Gao, C. Y. Hsu, T. Loh, B. Hwarng, D. Koh, Role of microbiological factors in predicting early childhood caries. *Pediatric dentistry* **36**, 348-354 (2014); published online EpubJul-Aug (
8. J. Kuhnisch, I. Goddon, S. Berger, H. Senkel, K. Bucher, T. Oehme, R. Hickel, R. Heinrich-Weltzien, Development, methodology and potential of the new Universal Visual Scoring System (UniViSS) for caries detection and diagnosis. *International journal of environmental research and public health* **6**, 2500-2509 (2009); published online EpubSep (10.3390/ijerph6092500).
9. J. Kuhnisch, K. Bucher, V. Henschel, A. Albrecht, F. Garcia-Godoy, U. Mansmann, R. Hickel, R. Heinrich-Weltzien, Diagnostic performance of the universal visual scoring system (UniViSS) on occlusal surfaces. *Clinical oral investigations* **15**, 215-223 (2011); published online EpubApr (10.1007/s00784-010-0390-1).
10. N. Pitts, Detection, assessment, diagnosis, and monitoring of caries. Monographs in oral science. *Basel, Karger*, (2009).
11. A. Camarinha-Silva, R. Jauregui, D. Chaves-Moreno, A. P. Oxley, F. Schaumburg, K. Becker, M. L. Wos-Oxley, D. H. Pieper, Comparing the anterior nare bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environmental microbiology* **16**, 2939-2952 (2014); published online EpubSep (10.1111/1462-2920.12362).



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Herrn
PD Dr. Jahn Kühnisch
Poliklinik für Kieferorthopädie
Goethestr. 70
80336 München

Vorsitzender:
Prof. Dr. W. Eisenmenger
Telefon+49 (0)89 440055191
Telefax+49 (0)89 440055192
Ethikkommission@
med.uni-muenchen.de
www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de

Anschrift:
Pettenkoferstr. 8a
D-80336 München

München, 15.12.2014 Hb/ck

Unser Zeichen: **554-14** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

Beratung nach geltendem Fakultätsrecht

Titel: Analyse des Transkriptoms aus kavitierten, kariösen Läsionen unter besonderer Berücksichtigung der Interaktion zwischen *Streptococcus mutans* und *Candida albicans*
Antragsteller: PD Dr. Jahn Kühnisch, Poliklinik für Kieferorthopädie, Goethestr. 70, 80336 München

Sehr geehrter Herr Dr. Kühnisch,

die Ethikkommission hat Ihren Antrag vom 08.12.2014 zur o.g. Studie auf der Basis der vorgelegten Unterlagen und Informationen geprüft.

Die Ethikkommission (EK) erhebt keine Einwände gegen das Forschungsprojekt /gegen die Durchführung der Studie. Allerdings bittet die EK darzulegen, dass sich das „Labor“ in Braunschweig und nicht an der LMU befindet.

Bitte achten Sie darauf, dass in den geänderten Unterlagen alle Änderungen (Streichungen, Änderungen / Ergänzungen) optisch kenntlich gemacht werden. Bitte nutzen Sie nach Möglichkeit die in gängigen Textbearbeitungsprogrammen verfügbare Funktion ‚Änderungen nachverfolgen‘.

Allgemeine Hinweise:

- Änderungen im Verlauf der Studie sind der EK zur erneuten Prüfung vorzulegen.
- Schwerwiegende unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie sind der EK mitzuteilen.
- Das Ende der Studie ist anzuzeigen und das Ergebnis vorzulegen.
- Die ärztliche und juristische Verantwortung bei der Durchführung der Studie verbleibt uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Eisenmenger
Vorsitzender der Ethikkommission

Mitglieder der Kommission:

Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. K. Hahn, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. H. H. Müller, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. Ch. Zach



**Sociodemographic determinants of spatial disparities in
early childhood caries – an ecological analysis in
Braunschweig, Germany**

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Community Dentistry and Oral Epidemiology</i> |
| Manuscript ID | CDOE-16-227.R2 |
| Manuscript Type: | Original Manuscript |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | <p>Meyer, Frederic; Helmholtz Centre for Infection Research Braunschweig, Microbial Communication</p> <p>Karch, André; Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Epidemiology, ESME Epidemiological and Statistical Methods Research Group; Medizinische Hochschule Hannover</p> <p>Schlinkmann, Kristin; Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Epidemiology, ESME Epidemiological and Statistical Methods Research Group</p> <p>Dreesman, Johannes; Governmental Institute of Public Health of Lower Saxony</p> <p>Horn, Johannes; Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Epidemiology, ESME Epidemiological and Statistical Methods Research Group</p> <p>Rübsamen, Nicole; Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Epidemiology, ESME Epidemiological and Statistical Methods Research Group</p> <p>Sudradjat, Henny; Health care center, city of Braunschweig, Dentistry</p> <p>Schubert, Rainer; Social services department, Health Strategy</p> <p>Mikolajczyk, Rafael; Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Epidemiology, ESME Epidemiological and Statistical Methods Research Group; Medizinische Hochschule Hannover</p> |
| Keywords: | Early childhood caries, spatial regression, spatial disparities, risk factors |
| Abstract: | <p>Objectives: Early childhood caries (ECC) is a continuing problem worldwide. In Germany, 10% to 15% of the six-year-old children suffer from severe ECC, and even more had at least experience with ECC. The aim of our study was to identify spatial disparities of dental health (measured by dmft (decayed missing filled teeth) index) of children in the city of Braunschweig and to evaluate if these disparities can be explained by sociodemographic risk factors.</p> <p>Methods: We examined the dental health of children aged three to six years visiting a daycare center (DCC) in the metropolitan area of Braunschweig between 2009 and 2014 by combining data on dental health from the annual visits of the local health service in Braunschweig's 151 DCCs and aggregated data on sociodemographic factors for Braunschweig's city districts. We assessed longitudinal patterns of change in average dmft index at district level from 2009 to 2014 by a finite mixture model. We</p> |

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

| | |
|--|--|
| | <p>analyzed spatial autocorrelation of the district's average dmft indices by Moran's I in order to identify spatial clusters. With a spatial lag model, we evaluated if sociodemographic risk factors were associated with high dmft indices and if spatial disparities remained after adjusting for these sociodemographic factors.</p> <p>Results: The average dmft index has decreased slightly ($\beta=-0.048$; $p<0.03$; CI 95% [-0.079; -0.017]) from 2009 to 2014. The finite mixture model resulted in four different groups of trajectories over time. While three groups showed a decrease of the dmft index, one group showed an increase of the dmft index from 2009 to 2014. Moran's I test statistic showed strong evidence for spatial clustering (Moran's I 0.30, $p=0.002$). A cluster of districts with high dmft values was identified in the center of the city. The spatial lag model showed that both, the proportion of unemployed persons (aged 16-65) and the proportion of persons with migration background, were associated with the dmft values at district level. After adjusting for these factors, no further spatial heterogeneity was present.</p> <p>Conclusion: We identified regional clusters for poor dental health in a German city and showed that these clusters can be explained by sociodemographic risk factors. The results support the need of targeted interventions and prevention measures in regions with less favorable sociodemographic characteristics.</p> |
| | |

Sociodemographic determinants of spatial disparities in early childhood caries – an ecological analysis in Braunschweig, Germany

Frederic Meyer¹⁾, André Karch^{2), 7)}, Kristin Maria Schlinkmann²⁾, Johannes Dreesman⁵⁾, Johannes Horn²⁾, Nicole Rübsamen²⁾, Henny Sudradjat³⁾, Rainer Schubert⁴⁾, Rafael Mikolajczyk^{2), 6), 7)*}

¹⁾ Microbial Communication, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig

²⁾ ESME Epidemiological and Statistical Methods Research Group, Department of Epidemiology, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig

³⁾ Health care center, city of Braunschweig, Head of the department for dentistry

⁴⁾ Social services department, Health strategy, City of Braunschweig

⁵⁾ Governmental Institute of Public Health of Lower Saxony, Hannover, Germany

⁶⁾ Hannover Medical School (MHH)

⁷⁾ German Center for Infection Research, site Braunschweig-Hannover

*** Corresponding author**

Key words: Early childhood caries, ECC, spatial regression, spatial disparities, risk factors

Abstract

Objectives: Early childhood caries (ECC) is a continuing problem worldwide. In Germany, 10% to 15% of six-year-old children suffer from severe ECC, and even more have had at least some experience of ECC. The aim of our study was to identify spatial disparities in dental caries experience (measured by dmft (decayed missing filled teeth) index) of children in the city of Braunschweig and to evaluate whether these disparities can be explained by sociodemographic characteristics.

Methods: We examined the dental health of children aged three to six years visiting a daycare center (DCC) in the metropolitan area of Braunschweig between 2009 and 2014 by combining data on dental health from the annual visits of the local health service in Braunschweig's 151 DCCs with aggregated data on sociodemographic factors for Braunschweig's city districts. We assessed longitudinal patterns of change in average dmft index at district level from 2009 to 2014 using a finite mixture model. We analyzed spatial autocorrelation of the district's average dmft indices by Moran's I in order to identify spatial clusters. With a spatial lag model, we evaluated whether sociodemographic risk factors were associated with high dmft scores and whether spatial disparities remained after adjusting for these sociodemographic characteristics.

Results: The average dmft index decreased slightly ($\beta=-0.048$; $p<0.03$; CI 95% [-0.079; -0.017]) from 2009 to 2014. The finite mixture model resulted in four different groups of trajectories over time. While three groups showed a decrease in dmft score, one group showed an increase from 2009 to 2014. Moran's I test statistic showed strong evidence for spatial clustering (Moran's I 0.30, $p=0.002$). A cluster of districts with high dmft values was identified in the center of the city. The spatial lag model showed that both the proportion of unemployed persons (aged 16-65) and the proportion of persons with migration background were associated with the dmft values at district level. After adjusting for these, no further spatial heterogeneity were observed.

Conclusion: We identified regional clusters for poor dental health in a German city and showed that these clusters can be explained by sociodemographic characteristics. The findings support the need of targeted interventions and prevention measures in regions with less favorable sociodemographic characteristics.

Introduction

Early childhood caries (ECC) is a disease caused by oral bacteria, which affects the primary dentition of children. The risk of ECC (as a multifactorial disease) is influenced by the composition of the saliva, dietary habits, mineralization and demineralization of the enamel, the composition of the dental plaque and teeth brushing habits (especially by not using fluoridated toothpaste regularly) 1, 2. Although it affects only the primary dentition, several long-term consequences have been described, underlining ECC's high public health relevance 3-5: On the one hand, ECC increases the risk for caries of the permanent teeth and poor oral health in later life; on the other hand, associations of ECC with chronic non-communicable diseases such as cardiovascular disorders have been suggested 5, 6. In 2003, the World Health Organization (WHO) released worldwide as well as national targets for oral health to be fulfilled by 2020. One of these targets is to decrease the number of decayed, missing and filled teeth (dmft index) 7, 8 per child below 1 and to increase the proportion of naturally healthy teeth in Germany to 80% 9, 10. In 2009, there was a high heterogeneity of average dmft indices for six and seven-years-old children described at the level of federal states in Germany, ranging from 1.30 (Saarland) to 2.56 (Thuringia) ¹¹. Children in Lower-Saxony, the federal state our study was performed in, had an average dmft index of 1.78. ¹¹. Since all of the German states' average dmft indices are well above the WHO target, it is important to investigate which factors are associated with high caries experience in Germany so that tailored intervention programs can be developed. Previous studies indicate that risk factors for caries experience in Germany can be described on an individual level (including factors like socioeconomic status (SES), low income, migration background ¹², and a low education level ¹³⁻¹⁶). All of them are related to poor oral health habits like sugar intake or infrequent teeth brushing 1. Nevertheless, spatial analyses aiming at the identification of local clustering of poor oral health are scarce. A study from Brazil showed a local cluster of good oral health for 12-year-old children in the city center of Piracicaba compared to the (deprived) outlying districts ¹⁷. While the city center showed high SES, the outlying districts are characterized by low SES. It is important to identify spatial clustering of poor oral health for intervention programs. The goal of these programs should be getting in touch with as many families as possible at high risk for ECC. Contacting these families is easier on an aggregated regional than on an individual level. This makes the identification of local clusters of poor oral health to an important target when trying to fulfill WHO goals for oral health in Germany. To date, it is unclear at which regional level spatial heterogeneities in oral health in Germany appear, how big they are, and whether they can be explained by underlying disparities in SES ¹⁸, or

whether there are additional factors (e.g. environmental ones) responsible for the observed differences. Accordingly, we analyzed data from a German city, Braunschweig, which has a good health reporting system for oral health data and also provides socioeconomic data for the city's districts. The aim of this study was to assess whether there is evidence for clustering of dmft indices in the city of Braunschweig and to evaluate whether spatial disparities can be explained by sociodemographic factors.

Methods

In Germany, dental service is provided free of charge for all children. It is however in the responsibility of the parents to decide to make an appointment for their children at the dentist's office. Therefore, many children do not see a dentist before their third birthday¹⁹. Local health authorities provide therefore annual visits to daycare centers (DCC). The visits are financed by the city while prophylaxis performed by the Health authority is financed by health insurances. All children who joined the annual inspection of teeth (provided by the dental service of the local health authority) in DCCs in the city of Braunschweig from 2009 to 2014 (n=6,279) were considered for inclusion in this study. The service is provided for all of the 151 DCCs in Braunschweig every year. In this study, we included only children three to six years old, because this is the risk group for ECC.

Dental health data from 2009 to 2014 were provided by the dental health service of the local health authorities in Braunschweig. Five different dentists performed the oral investigations from 2009 to 2014. While the head of the programme is officially calibrated against the German working group for youth dental care with a Cohen's kappa of 0.88, the other four are trained internally. However, there is no systematic reporting of training results so that no inter-rater reliability measure can be provided. The database contained all data collected during the annual visits in each of the participating daycare centers in Braunschweig including average dmft index per DCC and the number of investigated children per DCC (N). Based on these data, we calculated the average dmft index for each district and each year from 2009 to 2014 from the DCC averages by weighting them by the number of investigated children. Aggregated sociodemographic data at district level were provided by the local health authority in Braunschweig. We used the latest available data from 2012, including information about unemployed persons aged 16-65 (in %) and persons with a migration background (in %), for each of the 30 districts. We used the proportion of unemployed people as a proxy for SES at district level. The shapefile data (.shp) used for mapping of the district data was provided by the geo-information service of the city of Braunschweig. Shapefiles store non-topological geometry attribute information for the spatial features of a dataset. In

case of our study, this included the city structure of Braunschweig and each city district. Shapefiles consist of three different levels of information (a main file, an index file and a dBASE table). The main file is a variable-record-length file in which each record describes a shape with a list of its vertices. The index file contains the offset of the main file record. The dBASE table contains feature attributes with one record per feature. The relationship between geometry and attributes is based on the record number.

Statistical Analysis

Several statistical methods were applied to investigate the districts' average dmft values over the years 2009 to 2014. For determining the functional form of the overall longitudinal trend in dmft indices, we chose a fractional polynomial approach using the Stata command `mfp`²⁰. A linear trend was identified as the best one by the fractional polynomial approach (see Fig. 1). In the following analysis we used the same approach to identify longitudinal trends over time for each district. The district's trajectories were assessed for their underlying common patterns. For this purpose, trajectories were described using finite mixture modelling as implemented in the *traj* package in Stata 12²¹. Mixture models can be used to model unobserved heterogeneity in a population. Polynomial functions are used to model the relationship between year and dmft index with model parameters allowed to differ across groups. This way, finite mixture models allow for identification of population heterogeneity not only at the level of dmft index at a given time point, but also in its development over time. We applied the method for target numbers of patterns from one to five; the selection of the optimal number of trajectories was based on the Bayesian Information Criterion (BIC)^{21, 22}. We increased the number of trajectories used until increasing model complexity led to no further decrease of BIC values.

The spatial autocorrelation was investigated for the districts' average dmft index values from 2014. For this purpose, first the neighbourhood relationship among the number of districts (n) was defined according to the Queen's contiguity rule and based on this a $n \times n$ neighboring matrix W was constructed, where $w_{ij} = 1$ if district i and district j are neighbours and otherwise $w_{ij} = 0$, respectively²³. Based on this, Moran's I was calculated²⁴. To assess whether sociodemographic factors were associated with poor oral health, we considered the proportion of unemployed persons (aged 16-65) and the proportion of persons with a migration background as explanatory variables for district level dmft data from 2014. With these explanatory variables, we fitted a spatial lag model which is a linear model of the form

$$y = \rho Wy + X\beta + \varepsilon.$$

Here, y is a vector of observations on the dependent variable (that is the districts' dmft values). W is the neighbouring matrix introduced above. X is a matrix of observations on the explanatory variables, ε is a vector of independent and identically distributed error terms, and ρ and β are parameters. Beta (β) is used for the effect size of a predictor in the model. While a beta of 1 represents a one-point increase in the outcome per unit increase in the predictor, a beta of 0 represents no association between predictor and outcome. Rho (ρ) is the spatial lag coefficient and reflects the spatial dependence inherent in the sample data. This coefficient measures the average influence on observations by their neighboring observations. The values range from -1 to 1, while 0 means no spatial autocorrelation. The spatial lag part of the model ρWy aims to capture unobserved spatially correlated explanatory variables in order to adjust the estimation procedure for spatial clustering²³. We investigated an "empty" spatial lag model without explanatory variables. Afterwards, we included the proportion of the unemployed persons and the proportion of persons with a migration background in the model together as well as each variable alone. To calculate the proportion of variation in dmft at district level, we used the eta-squared (η^2) effect size. Eta-squared is defined as:

$$\eta^2 = SS_{effect} / SS_{total}.$$

SS_{effect} is defined as the sums of squares for whatever effect of interest, and SS_{total} are the total sums of squares for all effects, interactions, and errors in the model²⁵.

All analyses were performed using Stata (longitudinal data) and the open source statistical software R (version 3.2.1). Besides the standard R packages, we used the packages `sp`, `rgdal`, `maptools`, `ggplot`, `RColorBrewer`, and `ClassInt` for visualization of spatial data. For data analysis and data management, we used the packages `acs`, `truncreg`, `MASS`, `stats`, `DescTools`, and `spdep`. The package `spdep` (and specifically the `lagsarlm` command) was used for building the spatial lag model.

Results

We included data from 34,808 children from three to six years; 5,527 of these children were investigated in 2014 representing a mean sample size of 184 children per district (for further information see supplementary table 1). Each DCC could be unambiguously allocated to one of the 30 districts of Braunschweig. The mean size of the DCCs was 42.2 children in 2014.

The average weighted dmft index for Braunschweig as measured in our study decreased from 1.25 in 2009 to 1.0 in 2014 with a minimum of 0.83 in 2013 (supplemental Tab. 1; $\beta=-0.048$; $p<0.03$; CI 95% [-0.079; -0.017]). We identified four different longitudinal trajectory patterns of dmft index values. Three groups of trajectories represented patterns with decreasing dmft indices over time and differed only with respect to their starting values (group 1, 3, 4), while one group (group 2) showed an increasing pattern (Fig. 2A). Most of the districts belonged to group 1 (46.4%), followed by group 3 (26.6%), group 4 (19.9%); only two districts showed increasing dmft values as observed in group 2 (7.1%) (Fig. 2B) (for further details, see supplemental Tab. 1).

Regarding the sociodemographic data, the proportion of unemployed persons varied between 2% and 10%, while the proportion of persons with migration background was between 5% and up to around 37% (supplemental Tab. 2).

Moran's I test statistic for dmft indices at district level showed a value of 0.30 ($p=0.001$), indicating strong evidence for spatial clustering. This was confirmed when assessing the empty spatial lag model ($Rho=0.54$; $p=0.02$) (Table 1). This was confirmed when assessing the empty spatial lag model ($Rho=0.54$; $p=0.02$) (Table 1). In model 2, the dmft index increases by 0.124 points per 1% increase of the proportion of the unemployed persons (which is described by the β -coefficient). In model 3, the dmft index increases by 0.038 points per 1% increase in the proportion of persons with migration background. Model 4 shows a similar result with slightly decreased values. In all cases, Rho is positive and significantly different from 0. A cluster of districts with high dmft index values was visually identified in the center of the city (Fig. 3).

The spatial lag model showed that both sociodemographic factors, i.e. the proportion of unemployed persons (aged 16-65) and the proportion of persons with migration background, were associated independently with increased dmft values (Table 1). After adjusting for both variables, there was no evidence of spatial heterogeneity in the model ($p=0.47$), showing that all spatial heterogeneity in the model is explained by these two factors; they can therefore be seen as the main causes for regional disparities of dmft indices in our study. Moran's I for the residuals of the spatial lag model was -0.07 ($p=0.64$), further supporting our finding of no residual spatial clustering after adjusting for sociodemographic measures.

Discussion

In this study, we demonstrated regional clustering of high dmft index values within a mid-size German city (Braunschweig). Regional clustering disappeared after adjusting for spatial

sociodemographic disparities. The regional clusters can be explained by the proportion of unemployed persons as well as the proportion of persons with migration background, and even better with a combination of both in a spatial lag model. Moreover, we showed a slight decrease in the mean dmft index in Braunschweig from the year 2009 to 2014, indicating an improvement in oral health over the study period.

The strength of our analysis is the good data coverage of dental data, which were collected with long-time experience of the dentists, who are responsible for the dental examinations every year and who are trained regularly. Furthermore, state of the art spatial analyses were performed in order to understand the interplay of geographic and social risk factors. However, there are several limitations to our study. Generally, analysis using aggregated data is prone to ecological fallacy. Since previous individual risk factors analyses provided consistent findings, this does not appear to be a problem in our analysis. As we were interested in spatial effects, the use of spatially aggregated data was appropriate. With regard to spatial effects, there is a possibility that children did not necessarily attend a DCC in the district of their residence, potentially leading to misclassification of dmft index values and biased estimates of the association between dmft indices and SES variables. Another problem is the limited availability of variables indicating social disparities. For example, social index of the city of Braunschweig contains also information on proportion of habitants receiving social welfare, but the data for this variable were only available for the end of the year 2012. Theoretically, data for children receiving social welfare were also available and would have been closest to the outcome of dmft in children, but the data come with severe limitations. Not all parents do register children who can possibly get social welfare. It is suggested that more than one third of all children (younger than 15 years old) do not receive state welfare to benefit from it, although they could get it ²⁶. Social data for all analyses were collected in 2012 and were used for the dmft data from 2014 in the spatial lag model. In times of high national and international mobility, markers of socio-economic status can change rapidly even on an aggregated district level, introducing the chance of misclassification to our study for the years after 2012. However, the major rise in international mobility observed in Europe during the refugee crisis in 2015 happened well after the end of our study so that potential effects on the main study results are estimated as unlikely. Nevertheless, changes in dmft index observed over time could rather be attributable to changes of SES over time (e.g. by changes in local population structure) than to true changes of oral health. Furthermore, SES can be better differentiated if dimensions of education and economic status are both considered. Also, the unemployed are only a subgroup of those of lower SES. Still, in the ecological analysis, it is

less important to correctly classify individual persons, and the proxy variable likely served its purpose well. Unfortunately, there were no data available from the dental examination about the composition of the saliva, dietary intake, enamel changes or dental plaques, making it impossible to assess the relative effect of these factors in our regression models. While it would have been interesting to examine in detail how the different components of the dmft index changed over time and were affected by spatial and sociodemographic factors, data were only available aggregated on dmft level, and could not be tracked down to the individual components. Since there is no water fluoridation in Germany, the fluoridation status of the districts, DCCs or individuals could not be assessed within this study. Topical fluoride applied by the dentists is not covered by the provided data.

Spatial analyses for oral health topics are scarce, and we found only two studies dealing with regional clustering of dmft index values and the related sociodemographic determinants for these disparities among children younger than six years^{17,27}. Comparing our data with a study from Berlin (2008/2009)¹⁸ that was dealing with oral health data and social data for each district, but did not use spatial analysis, and a study from Piracicaba (Brazil)¹⁷, our analysis showed similar findings for the association between high average dmft indices and a low social status. The distribution of poor health care and poor SES may differ in different cities depending on cultural and historical aspects: In some cities, the low-income districts are more often located in the center of a city (e.g. Braunschweig); in other cities, low-income areas are the suburban districts (e.g. Piracicaba/Brazil). While Berlin's average dmft index was 1.74 (2009) for six-year-old children, Braunschweig's dmft index for the three- to six-year-old children was 1.25 in 2009, possibly indicating better dental care in the latter. We also showed an improvement from 2009 to 2014 from 1.35 to 1.0, which is consistent with the efforts of local health authorities and their programs to contact high dmft index DCCs more often and communicate with the parents intensively.

However, two districts showed an increase of dmft-index over time. When we compare sociodemographic characteristics in these two districts with the districts with a decreasing dmft index we find that there is no difference in the proportion of unemployed persons ($p=0.62$) and the proportion of persons with migration background ($p=0.83$). As mentioned before, children do not necessarily attend a DCC in the district they are living. District 18 is neighbouring both districts with increasing dmft indices over time, and is the district with the highest weighted average dmft. Moreover, this district has one of the highest proportions of unemployed persons (8.5%) and persons with migration background (19.5%) in the city (for further details see supplementary table 2). One potential reason for the observed increase in

the two districts might be that the cross-district distribution of children to child care centers might have changed over time (e.g. by new child care centers close to district 18) with more children from district 18 visiting child care centers in the two districts with increasing dmft indices. Despite the correlation between proportion of unemployed persons and proportion of persons with migration background, both variables displayed independent associations with the dmft index in a model mutually adjusting for each other. While the per-one-percent-difference in dmft values was more than three times higher for the proportion of unemployed than for proportion of those with migration background, it should be borne in mind that there was a much larger variation in the proportion of migrants across the city districts. Based on eta-squared values, both variables explained similar proportion of variation in dmft at district level. Dietary and behavioral habits have been discussed to be the main pathways of poor oral health in individuals of low SES. Namely, these are more sugar intake and no dental attendance^{28,29}. Low SES families spend less money on dietary products³⁰. Typical products consumed by low SES persons are bread (mainly white bread), sugars, sweets and cakes as well as sweetened beverages³⁰. These products are associated with added fats and low vitamin status. Consequently, children from low SES families have a higher intake of sweetened sugary beverages than children from high SES families³¹. Sweetened sugary beverages have been described to be associated with a higher caries prevalence in a recent study from Georgia/USA³². In a similar way, nutritional habits of migrants can be the cause of associations observed for the proportion of migrants; this however, might not be the only explanation. A recent German review concluded that migrants do not have the same benefits from prevention measures, healthcare, and information about oral health issues as persons who were born in Germany³³. The main reason for that is a lower dental attendance because of sociocultural barriers and problems with the German language³³. Our findings showed the need for further interventions to reduce the dmft index and, thus, the proportion of children with ECC in order to fulfill WHO goals. ECC does not only lead to a poorer quality of life for affected children, but also to greater healthcare costs³⁴. Therefore, targeted interventions need to be planned. Interventions on the individual child level, however, are expensive and difficult to implement. More than 93% of children (three to five years old) in Germany visit DCCs³⁵. Hence, DCCs can be used as a place to inform the parents about the importance of prevention for oral health. Regular visits (twice a year) of dentists in DCCs should be implemented in districts at high risk. These could either be defined directly as a mean dmft above 1 (by taking into account dmft values from recent visits) or indirectly by using aggregated information on the social determinants of high risk

identified in this study (e.g. 75th percentile of proportion of unemployed persons or proportion of persons with migration background), During these visits parents and children will receive teaching on the importance of a healthy diet and tooth brushing (including fluoride application) after meals. While high-quality evidence is scarce for population-level interventions, there is evidence that individualized interventions targeted by population-level risk factor analysis can be efficient. Teaching mothers living in high risk districts good practice in oral health is, for example, an effective method to prevent children from caries and other oral diseases^{36, 37}.

Potential population-level interventions could cover the introduction of dental care education in antenatal classes aiming at a harmonized schedule for early dental appointments of newborns. This could be a potentially successful way to counteract the low proportions (12%) of children having seen a dentist in their first two years of life³⁸. Another potential intervention could be the combination of paediatric and dental care during early childhood since paediatric care is organized in compulsory visits³⁹. Moreover, dentists should identify during their DCC visits those individuals at need for a visit at the dentist's office as recommended by a recent German study⁴⁰. DCC-based interventions targeted to high-risk clusters could thus help in identifying individuals at risk and could support transferring hard to reach populations to individualized dental care. Since all city districts have a good coverage of dentists, there is a sufficient supply of dentists in regions with high dmft who could take over individualized care of individuals at risk.

Knowledge about the SES for each district can be used as a road book for planning these targeted interventions on a DCC level so that interventions can be introduced to those districts which need them most.

Conclusions

High caries experience is clustered spatially in a medium-sized German city. We identified sociodemographic disparities at district level as the main reasons for spatial heterogeneity. Spatial analyses can thus help not only in identifying but also in predicting regions at high risk for caries if no primary data is available. This can result in targeted intervention programs at district levels. District level interventions allow to reach a higher proportion of the individuals at risk and are therefore more efficient than individual-based interventions. DCCs provide thereby a perfect framework for dentists to examine, teach and fluoridate the children and possibly also the parents.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

Manuscript Copy

References

1. Behrendt A, Sziegoleit F, Muler-Lessmann V, Ipek-Ozdemir G, Wetzel WE. Nursing-bottle syndrome caused by prolonged drinking from vessels with bill-shaped extensions. *ASDC J Dent Child*. 2001;68(1):47-50, 12.
2. Borutta A, Wagner M, Kneist S. Early Childhood Caries: A Multi-Factorial Disease. *OHDMBSC*. 2010; Vol. IX(No. 1).
3. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005;83(9):661-9.
4. Bagramian RA, Garcia-Godoy F, Volpe AR. The global increase in dental caries. A pending public health crisis. *Am J Dent*. 2009;22(1):3-8.
5. Colak H, Dulgergil CT, Dalli M, Hamidi MM. Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med*. 2013;4(1):29-38.
6. FDI World Dental Federation C. The Challenge of Oral Disease – A call for global action. *The Oral Health Atlas*. 2nd ed. Geneva. 2015.
7. Klein H, Palmer CE, Knutson JW. Dental status and dental needs of elementary school children. *Public Health Reports*. 1938;53:751–755.
8. Schuller AA, Holst D. Oral status indicators DMFT and FS-T: reflections on index selection. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(3):155-9.
9. Hobdell M, Petersen PE, Clarkson J, Johnson N. Global goals for oral health 2020. *Int Dent J*. 2003;53(5):285-8.
10. Ziller S, Micheelis W, Oesterreich D, Reich E. Goals for oral health in Germany 2020. *Int Dent J*. 2006;56(1):29-32.
11. Pieper K. Epidemiologische Begleituntersuchung zur Gruppenprophylaxe. 2009.
12. Robert Koch-Institut (Hrsg), Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung (Hrsg). *Erkennen – Bewerten – Handeln: Zur Gesundheit von Kindern und Jugendlichen in Deutschland*. 2008.
13. Kuhnisch J, Senkel H, Heinrich-Weltzien R. [Comparative study on the dental health of German and immigrant 8- to 10-years olds in the Westphalian Ennepe-Ruhr district]. *Gesundheitswesen*. 2003;65(2):96-101.
14. Schenk L, Neuhauser H, Ellert U, Poethko-Müller C, Kleiser C, Mensik G. *Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS) 2003 – 2006: Kinder und Jugendliche mit Migrationshintergrund in Deutschland 2007*.

15. Rehman MM, Mahmood N, Rehman B. The relationship of caries with oral hygiene status and extra-oral risk factors. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2008;20(1):103-8.
16. Geyer S, Schneller T, Micheelis W. Social gradients and cumulative effects of income and education on dental health in the Fourth German Oral Health Study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2010;38(2):120-8.
17. Pereira SM, Ambrosano GM, Cortellazzi KL, Tagliaferro EP, Vettorazzi CA, Ferraz SF, et al. Geographic information systems (GIS) in assessing dental health. *Int J Environ Res Public Health*. 2010;7(5):2423-36.
18. Adloff I, Häßler K, Hermann S, Uhlig U, Meinlschmidt G. Mundgesundheits der Berliner Kinder im Schuljahr 2008/2009. 2010.
19. Garcia R, Borrelli B, Dhar V, Douglass J, Gomez FR, Hieftje K, et al. Progress in Early Childhood Caries and Opportunities in Research, Policy, and Clinical Management. *Pediatr Dent*. 2015;37(3):294-9.
20. Royston P, Ambler G, Sauerbrei W. The use of fractional polynomials to model continuous risk variables in epidemiology. *Int J Epidemiol*. 1999;28(5):964-74.
21. Jones BL, Nagin DS, Roeder K. A SAS procedure based on mixture models for estimating developmental trajectories. *Sociol Methods Res*. 2001;29:374-93.
22. Lukočienė O, Vermunt JK. Determining the Number of Components in Mixture Models for Hierarchical Data. In: Fink A, Lausen B, Seidel W, Ultsch A, editors. *Advances in Data Analysis, Data Handling and Business Intelligence: Proceedings of the 32nd Annual Conference of the Gesellschaft für Klassifikation e.V., Joint Conference with the British Classification Society (BCS) and the Dutch/Flemish Classification Society (VOC)*, Helmut-Schmidt-University, Hamburg, July 16-18, 2008. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 241-9.
23. Anselin L. Under the hood: Issues in the specification and interpretation of spatial regression models. *Agricultural economics*. 2002;27(3):247-67.
24. Moran PA. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*. 1950;37(1-2):17-23.
25. Brown JD. *Statistics Corner*: Questions and answers about language testing statistics: Effect size and eta squared. *Shiken: JALT Testing & Evaluation SIG Newsletter*. 2008;12(2):38-43.
26. Becker I. Armut in Deutschland: Bevölkerungsgruppen unterhalb der Alg II-Grenze. *German Socio-Economic Panel Study (SOEP)*. 2007:36f.

27. Antunes JL, Narvai PC, Nugent ZJ. Measuring inequalities in the distribution of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(1):41-8.
28. Hobdell MH, Oliveira ER, Bautista R, Myburgh NG, Lalloo R, Narendran S, et al. Oral diseases and socio-economic status (SES). *Br Dent J.* 2003;194(2):91-6; discussion 88.
29. Mbawalla HS, Masalu JR, Astrom AN. Socio-demographic and behavioural correlates of oral hygiene status and oral health related quality of life, the Limpopo-Arusha school health project (LASH): a cross-sectional study. *BMC Pediatr.* 2010;10:87.
30. Darmon N, Drewnowski A. Does social class predict diet quality? *Am J Clin Nutr.* 2008;87(5):1107-17.
31. Han E, Powell LM. Consumption patterns of sugar-sweetened beverages in the United States. *J Acad Nutr Diet.* 2013;113(1):43-53.
32. Wilder JR, Kaste LM, Handler A, Chapple-McGruder T, Rankin KM. The association between sugar-sweetened beverages and dental caries among third-grade students in Georgia. *J Public Health Dent.* 2015.
33. Aarabi G, Reißmann DR, Heydecke G, Farhan D, Kofahl C. Oral health of people with migration background in Germany –a critical evaluation. *Deutscher Ärzte-Verlag | DZZ | Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift |.* 2013;5(68):280-7.
34. Casamassimo PS, Thikkurissy S, Edelstein BL, Maiorini E. Beyond the dmft: the human and economic cost of early childhood caries. *J Am Dent Assoc.* 2009;140(6):650-7.
35. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden. Kindertagesbetreuung in Deutschland 2012. 2012.
36. Kay EJ, Locker D. Is dental health education effective? A systematic review of current evidence. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1996;24(4):231-5.
37. Kowash MB, Pinfield A, Smith J, Curzon ME. Effectiveness on oral health of a long-term health education programme for mothers with young children. *Br Dent J.* 2000;188(4):201-5.
38. Slack-Smith LM. Dental visits by Australian preschool children. *J Paediatr Child Health.* 2003;39(6):442-5.
39. Wawrzyniak MN, Boulter S, Giotopoulos C, Zivitski J. Incorporating caries prevention into the well-child visit in a family medicine residency. *Fam Med.* 2006;38(2):90-2.
40. Wagner Y, Heinrich-Weltzien R. Evaluation of a regional German interdisciplinary oral health programme for children from birth to 5 years of age. *Clin Oral Investig.* 2016.

Figures

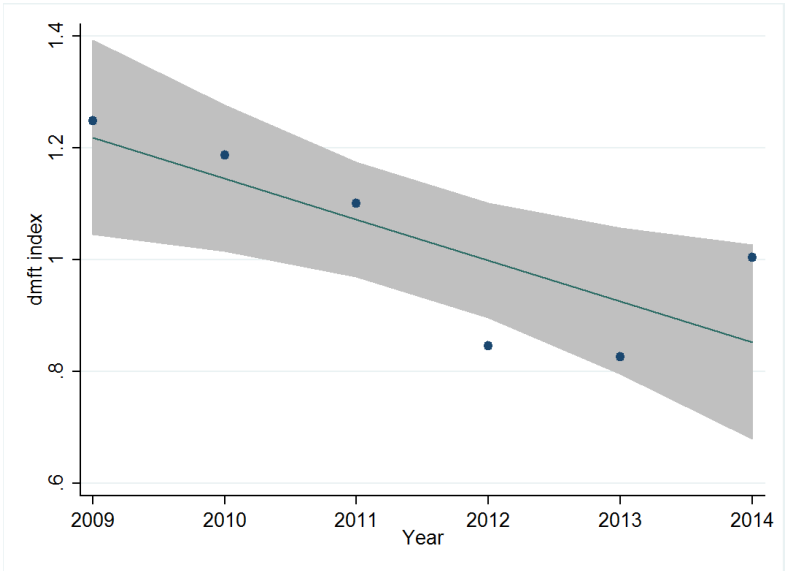


Figure 1: Dmft changes over time on a city level. A fractional polynomial approach was used to identify the best model for further analyses; a linear model was identified as the most likely underlying model in the source population.

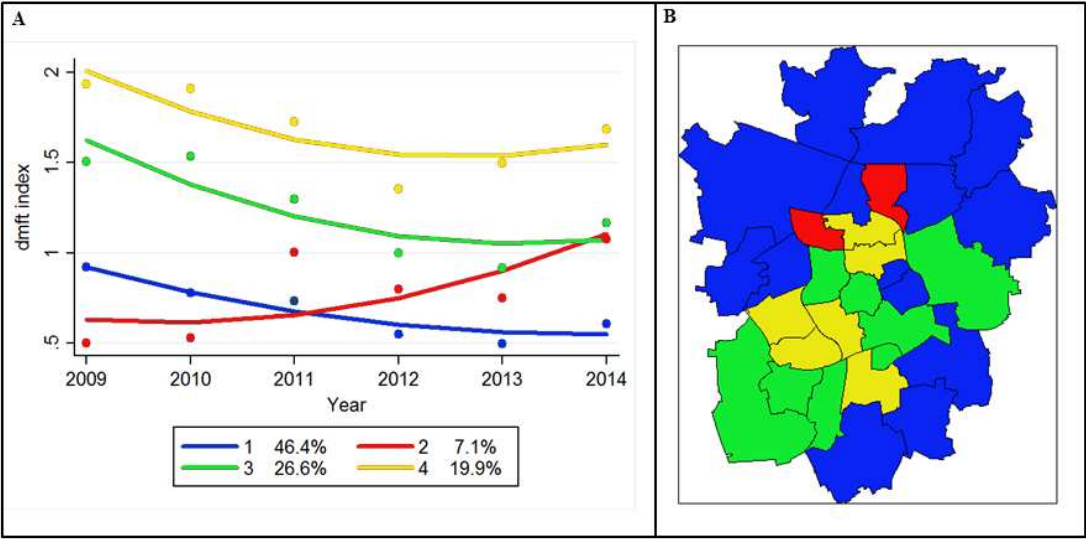


Figure 2: Dmft changes over time: **A:** The four different trajectory groups show different longitudinal patterns. **B:** Trajectory groups assigned to the city districts of Braunschweig. For a detailed view, see supplemental Tab. 1.

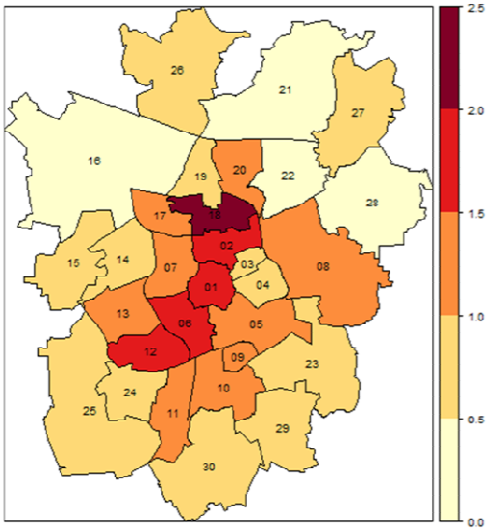


Figure 3: Map of Braunschweig with plotted weighted dmft index for each district in 2014 (Moran's $I=0.3$ ($p=0.002$), digits indicate districts, color scale indicates dmft index).

Tables

Table 1: Results of the spatial lag models (each model includes spatial term for districts).

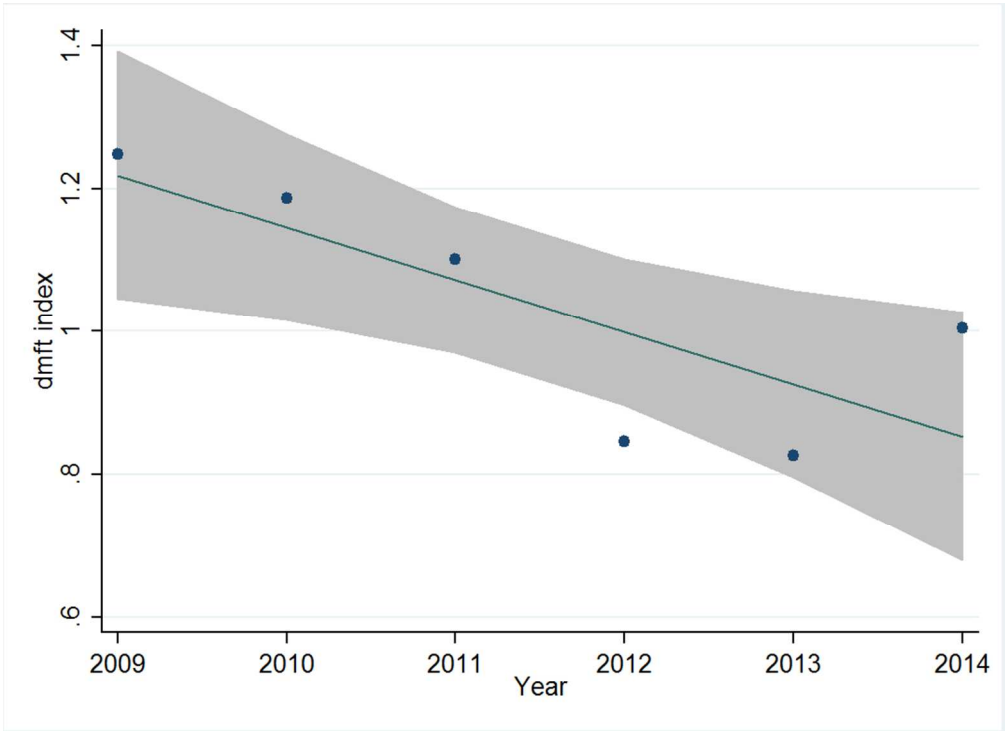
| | Co-variables | $\hat{\beta}$ | p value | CI ¹⁾ 95% lower | CI ¹⁾ 95% upper | Rho (ρ)* | AIC*** | Eta-squared(η^2) |
|----------------|---|---------------|---------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------|--------|-------------------------|
| Model 1 | None | | | | | 0.54 (p=0.02) | 36.142 | - |
| Model 2 | Proportion of unemployed persons (aged 16-65) ** | 0.124 | <0.01 | 0.075 | 0.173 | 0.23 (p=0.28) | 25.449 | 0.506 |
| Model 3 | Proportion of persons with migration background** | 0.038 | <0.01 | 0.022 | 0.053 | 0.23 (p=0.28) | 25.283 | 0.509 |
| Model 4 | Proportion of unemployed persons (aged 16-65)** | 0.073 | 0.03 | 0.006 | 0.139 | 0.15 (p=0.47) | 23.184 | 0.074 |
| | Proportion of persons with migration background** | 0.023 | 0.03 | 0.001 | 0.044 | | | 0.071 |

* coefficient for residual spatial correlation heterogeneity

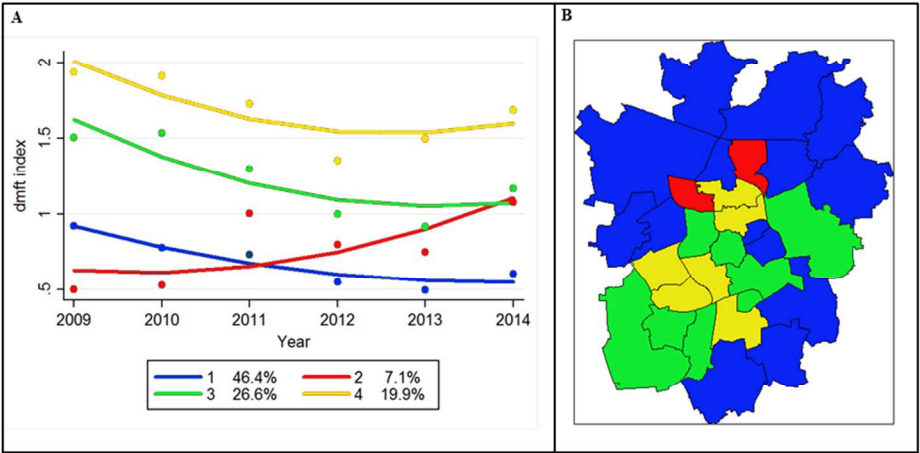
** per 1% increase

*** Akaike information criterion

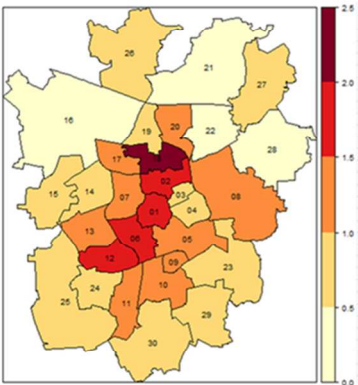
¹⁾ CI – confidence interval



378x275mm (72 x 72 DPI)



254x190mm (96 x 96 DPI)



254x190mm (96 x 96 DPI)